



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular



**FERNANDO HITOMI MATSUBARA**

**ESTUDO DOS PEPTÍDEOS PERTENCENTES À FAMÍLIA ICK  
PRESENTES NO VENENO DAS ARANHAS DO GÊNERO  
*Loxosceles***

**CURITIBA  
2015**

**FERNANDO HITOMI MATSUBARA**

**ESTUDO DOS PEPTÍDEOS PERTENCENTES À FAMÍLIA ICK  
PRESENTES NO VENENO DAS ARANHAS DO GÊNERO  
*Loxosceles***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Olga Meiri Chaim

**CURITIBA**

**2015**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR**

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná  
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

---

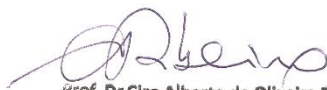
**DECLARAÇÃO**

Declaramos para os devidos fins que **Fernando Hitomi Matsubara**, no dia 26 de Fevereiro de 2015, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (UFPR) defendeu sua Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular, intitulada: "Estudo de peptídeos da família ICK presentes no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*", com a banca examinadora constituída pelos Profs. Drs. Carlos Delfin Chávez Olórtgui (Universidade Federal de Minas Gerais), Rafael Bertoni da Silveira (Universidade Estadual de Ponta Grossa), Rubens Bertazolli Filho (Universidade Federal do Paraná), Nilson Ivo Tonin Zanchin (Instituto Carlos Chagas), e Silvio Sanches Veiga (Orientador e presidente da banca examinadora da Universidade Federal do Paraná), e foi Aprovado.

A solicitação de emissão do Diploma de Doutor em Biologia Celular e Molecular ficará condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Esta declaração tem validade de 60 (sessenta) dias.

Curitiba, 26 de Fevereiro de 2015



Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro  
Coord. do Programa de Pós-Graduação  
Em Biologia Celular e Molecular  
Matr./UFPR 104132

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR**

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná  
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

**ATA DA TRECENTÉSIMA SETUAGÉSIMA SETIMA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Aos vinte e seis dias do mês de Fevereiro de dois mil e quinze, às 08h00min, nas dependências do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, composta pelos Profs: Drs. Carlos Delfin Chávez Olórtégui (Universidade Federal de Minas Gerais), Rafael Bertoni da Silveira (Universidade Estadual de Ponta Grossa), Rubens Bertazolli Filho (Universidade Federal do Paraná), Nilson Ivo Tonin Zanchin (Instituto Carlos Chagas), e Silvio Sanches Veiga (Orientador e presidente da banca examinadora da Universidade Federal do Paraná), com a finalidade de julgar a Tese do candidato **Fernando Hitomi Matsubara**, intitulada: "Estudo de peptídeos da família ICK presentes no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*" para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular. O candidato teve em torno de 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação e cada examinador, teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de mais 30 (trinta) minutos para resposta do candidato ou de 60 (sessenta) minutos, quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo orientador, Dr. Silvio Sanches Veiga. Após analisar a tese e arguido o candidato, os membros da banca examinadora deliberaram pela ".....", habilitando-o ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e Molecular. A emissão do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

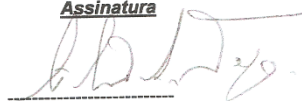
**Examinador/Afiliação**

**Parecer**

**Assinatura**

**Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga**  
Orientador e presidente da banca  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

APROVADO



**Prof. Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtégui**  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

APROVADO



**Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira**  
Instituto Carlos Chagas - ICC

APROVADO



**Prof. Dr. Rubens Bertazolli Filho**  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

APROVADO



**Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin**  
Instituto Carlos Chagas - ICC

APROVADO



**Aos meus pais, pela oportunidade que me concederam de poder me dedicar integralmente aos estudos! Pelo apoio incondicional e generosidade constante durante esta longa caminhada!**

**Muito Obrigado!**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga, por compartilhar incentivos e conhecimento durante todos esses anos de convívio! Por ter me recebido da melhor forma no laboratório e por ter depositado sua confiança em meu trabalho. Agradeço, sobretudo, por proporcionar a oportunidade de conviver com um grupo especial de pessoas no Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos!

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Olga Meiri Chaim, por todas as discussões científicas e incentivos. Por ser generosa e, sobretudo, humana, aconselhando e motivando a todo instante!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Senff Ribeiro, por todos os conselhos acadêmicos e pessoais. Agradeço toda a motivação e inspiração que despertou em mim durante esses anos e por todos os momentos descontraídos!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luiza Helena Gremski, pela prontidão em me ajudar em todos os experimentos. Por ser um exemplo de profissionalismo e disciplina. Muito obrigado por toda a paciência e disposição!

À Dilza Trevisan Silva, por todo o auxílio técnico-científico e pela grande amizade! Por tornar todos os momentos divertidos e leves! Pelo companheirismo em absolutamente todas as horas!

À Valéria Pereira Ferrer, por todas as discussões científicas e ensinamentos! Por ser exemplo de conduta ética e pela paciência. Por transmitir serenidade nos momentos mais tensos!

Ao Gabriel Otto Meissner, pela grande amizade e por todas as discussões de cunho científico! Obrigado pela ajuda e pelo companheirismo em todos os momentos!

À Aline Viana Bednaski, por tornar os momentos mais aterrorizantes sempre engraçados e tranquilizantes! Pela grande amizade de sempre e pela ajuda em muitos dos experimentos realizados!

Ao Adriano Marcelo Morgon pelo empenho e auxílio nas discussões técnico-científicas e afazeres do laboratório!

À Marianna Bóia Ferreira pela amizade e pela ajuda em muitos experimentos, discussões e tarefas do laboratório! Por estar presente nos momentos difíceis durante a realização desse projeto!

À Larissa Vuitika, pelos momentos divertidos e pela disposição em ajudar nas tarefas diárias e experimentos!

Ao Thiago Lopes de Mari pelo auxílio em muitos experimentos e tarefas durante esses anos!

Um agradecimento especial às ICs Bruna Carolina Lui Dias e Hanna Camara Justa por toda a ajuda nos experimentos e pela dedicação que demonstraram ao longo dos últimos meses deste projeto!

Aos demais amigos do LME: Thiago, Daniele, Alana, Paula, Paulo, Alysson e Maju. Muito obrigado por todos os momentos de companheirismo e pelo harmonioso convívio que compartilhamos durante os últimos anos! Agradeço todos os auxílios técnicos, os papos divertidos e os conselhos pessoais!

Às Dr<sup>as</sup>. Márcia Helena Appel, Chelin Auswaldt Steclan e Beatriz Essenfelder Borges por toda a ajuda no compartilhamento de reagentes e discussões científicas!

Aos amigos do Laboratório de Neurobiologia da UFPR, Luis, Max e Celso, por toda a ajuda nos procedimentos técnicos e pelos papos científicos!

À Marlene, secretária do programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR por todo o auxílio nas questões burocráticas!

Aos meus amigos Ana Paula Liboni, Emanuele Galvão, Carolina Nachi, Bruno Richter, Paulo Henrique Ferreira, Kristie Yamamoto, Eik Sorgi, Daniel Ferri, Mariana Nicolielo, Isabela Domiciano, Ana Carolina, Wanessa Paladini e Carla Alves! Obrigado por todos os incentivos! A amizade de vocês foi fundamental para a conclusão dessa etapa!

A todos os meus familiares por me motivarem a concretizar os meus objetivos pessoais e profissionais!

À CAPES, Fundação Araucária, SETI e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

**Muito Obrigado!**

**“Siga o caminho do pensador independente e que corre riscos. Exponha suas idéias ao perigo da controvérsia. Fale o que tenha em mente e tema menos ser tachado como "louco" do que o estigma do conformismo.”**

**Thomas John Watson**



## RESUMO

O conteúdo total do veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* permanece ainda desconhecido, entretanto, muitos estudos têm mostrado que se constitui uma mistura complexa de compostos biologicamente ativos. Por meio de análises eletroforéticas, observa-se a predominância de moléculas de baixa massa molecular (3-45 kDa), enquanto moléculas de alta massa molecular são menos abundantes. Os venenos de aranhas estão funcionalmente relacionados à defesa contra predadores e também à paralisia e captura de presas, especialmente insetos. As aranhas desenvolveram um arsenal de moléculas inseticidas, resultando em uma biblioteca combinatória de peptídeos que tem sido aprimorada durante sua evolução. Comumente, tais peptídeos consistem em moléculas de cadeia única com massa molecular variando de 3 a 10 kDa, ricos em resíduos de cisteína, os quais estabelecem pontes dissulfeto intramoleculares características. Essas pontes se organizam em um motivo estrutural característico denominado “nó de cistina inibidor” ou ICK (Inhibitor Cystine Knot) e, por isso, os peptídeos que o contém são denominados peptídeo ICK ou notinas (“*knottins*”). Recentemente, análises do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* (GREMSKI *et al.*, 2010) revelaram ESTs com similaridade a peptídeos ICK previamente descritas como LiTx (De CASTRO *et al.*, 2004). Sequências relacionadas à LiTx3, por exemplo, foram as mais abundantes no transcriptoma de *L. intermedia*, representando aproximadamente 13,9% de todas as ESTs obtidas e compreendendo 32% dos mRNAs codificantes de toxinas; as sequências relativas aos demais grupos de peptídeos ICK, LiTx1, LiTx2 e LiTx4 representaram 6,2%, 11,4% e 3,8% de todos os transcritos codificantes de toxinas, respectivamente. Devido a alta proporção de sequências codificantes para peptídeos ICK os objetivos deste trabalho foram o rastreamento de sequências codificantes de peptídeos ICK em outras duas aranhas do gênero (*Loxosceles gaucho* e *Loxosceles laeta*), bem como a obtenção de um peptídeo ICK semelhante à LiTx3 de forma recombinante em *Pichia pastoris* e sua caracterização biológica. A partir do RNA total extraído das glândulas de veneno de *L. laeta* e *L. gaucho*, procedeu-se o rastreamento de sequências relacionadas a peptídeos ICK; sequências codificantes para todos

os grupos de peptídeos ICK já descritos (LiTx1-4) foram encontradas, algumas revelando sutis diferenças na sua estrutura primária, outras revelando divergências importantes como a não presença de sequências consenso para modificações pós-traducionais importantes para a atividade biológica dos mesmos. Quanto à produção do peptídeo recombinante, várias formas foram obtidas; entretanto, análises de SDS-PAGE e western blotting mostraram que os peptídeos obtidos ou não apresentavam a conformação nativa ou apresentavam glicosilação indesejada. A atividade biológica desses peptídeos foi testada *in vivo* em insetos e *in vitro* em cultura de células, contudo nenhum efeito tóxico pode ser comprovado. As sequências encontradas em *L. laeta* e *L. gaucho* representam potenciais moléculas a serem exploradas do ponto de vista biotecnológico, ao passo que o peptídeo recombinante estudado deve ser expresso em outros modelos com intuito de obtê-lo em conformação adequada e, assim, comprovar sua atividade biológica.

Palavras-chave: Peptídeo ICK, notinas, *Loxosceles*, veneno, *Pichia pastoris*.

## ABSTRACT

The whole content of *Loxosceles* spider venom still remains unknown, but several studies have shown that it is a complex mixture of biologically active and inactive components. By electrophoretic analysis, the predominance of low molecular mass molecules (3-45kDa) can be observed, while high molecular mass ones are less abundant. Spider venoms are functionally related to defense against predators as well as to paralyze and capture a natural prey, especially insects. Spiders have developed an arsenal of insecticidal molecules, resulting in a combinatorial peptide library of peptides that has been improved during evolution. Commonly, such peptides consist of single chain molecules ranging between 3-10 kDa and are rich in cysteine residues, which form intramolecular disulfide bridges. These bridges establish a structural motif "Inhibitor Cysteine Knot" (ICK), then, these peptides are named ICK peptides or "knottins". Recently, a transcriptome analysis of *L. intermedia* venomous gland (GREMSKI *et al.*, 2010) has revealed ESTs with similarity to ICK peptides previously described as LiTx (De CASTRO *et al.*, 2004). LiTx3-related sequences were the most abundant in the *L. intermedia* transcriptome representing about 13.9% of all ESTs obtained and comprise 32% of toxin-encoding messengers; the sequences related to the other groups of ICK peptides, LiTx1, LiTx2 e LiTx4, represented 6,2%, 11,4% and 3,8% of all EST coding for toxins, respectively. Due to the high proportion of sequences encoding ICK peptides verified by the transcriptome analyses, the present study aimed screening ESTs related to these peptides in other two *Loxosceles* species (*L. gaucho* and *L. laeta*), as well as the obtainment of an ICK recombinant peptide with high similarity to LiTx3 in *Pichia pastoris* and its biological activity characterization. From total RNA purified from the venom glands of *L. gaucho* and *L. laeta*, it was performed the screening of ICK peptides sequences. ESTs coding for all groups of ICK peptides already described were found (LiTx1-4), some of them revealed subtle differences in their primary structures while others showed important divergences, for example, the absence of consensus sequences for posttranslational modifications that are essential for biological activities. The recombinant peptide was produced in different forms, however, SDS-PAGE and western blotting analyses indicated that they were not properly folded or presented unwanted glycosylation. The biological activity of the

recombinant peptide was tested in insects microinjection's assays and in vitro cultivated cells, nevertheless no toxic effects were proven. The sequences identified from *L. laeta* and *L. gaucho* RNA represent potential molecules to be biotechnologically explored, whereas the studied recombinant peptide must be expressed in other heterologous expressions models in order to obtain it in the native conformation and, thus, verify its biological activity.

Keywords: ICK peptides, knottins, *Loxosceles*, venom, toxins, *Pichia pastoris*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APS: Persulfato de amônio

BLAST : do inglês, “Basic Local Alignment Search Tool”

BOD: Demanda biológica de oxigênio (“Biological Oxygen Demand”)

BSA : Albumina de soro bovina (“Bovine Serum Albumin”)

cDNA: DNA complementar

CPPI: Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Estado do Paraná.

DEPC: dietilpirocarbonato

dNTPs: mistura de desoxirribonucleotídeo trifosfatados (A, T, G, C)

D.O.: densidade óptica

EST: Expressed Sequences Tag

Expasy: o inglês, “Expert Protein Analysis Sy

ICK: Inhibitory Cistine Knot (nó de cistina inibidor)

IPTG: isopropil- $\beta$ -D-tiogalatopiranosídeo

LB: Luria-Bertani

mRNA: RNA mensageiro

MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de magnésio

MgSO<sub>4</sub>: Sulfato de Magnésio

NaCl: Cloreto de sódio

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Fosfato de sódio monobásico

NCBI: do inglês, “National Center for Biotechnology Information”

Ni-NTA: Níquel-ácido nitrilotriacético

PBS: Solução salina tamponada com fosfato (“Phosphate Buffer Saline”)

PCR: reação em cadeia da polimerase

pI: ponto isoelétrico

pH: potencial hidrogeniônico

rpm: rotações por minuto

rRNA: RNA ribossômico

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa

SDS: dodecil sulfato de sódio ("sodium dodecyl sulfate")

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS ("Sodium Dodecyl Sulfate-Poliacrilamide Gel Electrophoresis")

T.A.: Temperatura ambiente

TEMED: N,N,N',N'- tetrametil-etilenodiamina

YPD: Yeast Extract-Peptone-Dextrose

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: IDENTIFICAÇÃO DAS ARANHAS-MARRONS (GÊNERO <i>Loxosceles</i> ).....	4
FIGURA 2: VENENO DE ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i> .....	6
FIGURA 3: Esquema do motivo estrutural Nó de Cistina Inibidor (ICK).....	10
FIGURA 4: $\omega$ -ACTX-Hv2a – Notina de <i>Hadronyche versuta</i> .....	11
FIGURA 5: TRANSCRIPTOMA DE <i>L. intermedia</i> .....	15
FIGURA 6: SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS PREDITAS DE NOTINAS OBTIDAS NO TRANSCRIPTOMA DE <i>L. intermedia</i> .....	16
FIGURA 7: Separação eletroforética dos venenos de <i>L. intermedia</i> , <i>L. gaucho</i> e <i>L. laeta</i> por meio de gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) gradiente 10-20%.....	30
FIGURA 8: Reatividade imunológica cruzada dos soros hiperimunes que reconhecem o veneno total de diferentes espécies de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> com o peptídeo recombinante U2-SCTX-Li1b.....	31
FIGURA 9: Amplificação das sequências relativas aos diferentes grupos de LiTx (LiTx1-4) analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,5%.....	32
FIGURA 10: Análise do perfil eletroforético dos produtos amplificados no PCR de colônia referente aos peptídeos semelhantes a LiTx1 em <i>L. gaucho</i> (à esquerda) e <i>L. laeta</i> (à direita) (gel de agarose 1,5%).....	33
FIGURA 11: Análise do perfil eletroforético dos produtos amplificados no PCR de colônia referente aos peptídeos semelhantes a LiTx2 em <i>L. gaucho</i> (à esquerda) e <i>L. laeta</i> (à direita) (gel de agarose 1,5%) .....	33
FIGURA 12: Análise do perfil eletroforético dos produtos amplificados no PCR de colônia referente aos peptídeos semelhantes a LiTx4 em <i>L. gaucho</i> (à esquerda) e <i>L. laeta</i> (à direita) (gel de agarose 1,5%).....	34
FIGURA 13: Análise do perfil eletroforético dos produtos amplificados no PCR de colônia referente aos peptídeos semelhantes a LiTx3 em <i>L. gaucho</i> (à esquerda) e <i>L. laeta</i> (à direita) (gel de agarose 1,5%).....	34
FIGURA 14: Sequências codificantes de peptídeos do grupo LiTx1 encontradas para <i>L. gaucho</i> e <i>L. laeta</i> e comparação com isoformas previstas para <i>L. intermedia</i> .....	37

FIGURA 15: Sequências codificantes de peptídeos do grupo LiTx2 encontradas para <i>L. gaucho</i> e <i>L. laeta</i> e comparação com isoformas preditas para <i>L. intermedia</i> .....	38
FIGURA 16: Sequências codificantes de peptídeos do grupo LiTx3 encontradas para <i>L. gaucho</i> e <i>L. laeta</i> e comparação com isoformas preditas para <i>L. intermedia</i> .....	39
FIGURA 17: Sequências codificantes de peptídeos do grupo LiTx4 encontradas para <i>L. gaucho</i> e <i>L. laeta</i> e comparação com isoformas preditas para <i>L. intermedia</i> .....	40
FIGURA 18: Esquema demonstrando a dinâmica de expressão do peptídeo em <i>Pichia pastoris</i> X33 de acordo com o protocolo de alta densidade (modificado a partir de Anangi et al., 2011). .....	60
FIGURA 19: Esquema demonstrando a dinâmica de expressão do peptídeo em <i>Pichia pastoris</i> KM71H de acordo com o protocolo proposto pelo kit de transformação “Pichia Easy Comp Kit” (Invitrogen).....	61
FIGURA 20: ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA E DO PCR DE COLÔNIA REFERENTE AO PEPTÍDEO pro-U2-SCTX-Li1b (gel de agarose 1,5%).. .....	68
FIGURA 21: ANÁLISE POR WESTERN BLOTTING DO PEPTÍDEO RECOMBINANTE PURIFICADO EXPRESSO EM <i>P. pastoris</i> X-33. ....	69
FIGURA 22: SEQUÊNCIAS DOS PEPTÍDEOS pro-U2-SCTX-Li1b ORIGINAL E DO PEPTÍDEO COM CÓDONS OTIMIZADOS PARA A EXPRESSÃO EM <i>P. pastoris</i> .....	70
FIGURA 23: ANÁLISE POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DO PEPTÍDEO RECOMBINANTE PURIFICADO EXPRESSO EM CEPA DE <i>P. pastoris</i> X-33. ....	71
FIGURA 24: ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO PCR DE COLÔNIA REFERENTE AO PEPTÍDEO MADURO U2-SCTX-Li1b (gel de agarose 1,5%).....	72
FIGURA 25: ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DA PURIFICAÇÃO DO PEPTÍDEO RECOMBINANTE MADURO POR MEIO DE SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING. ....	73
FIGURA 26: ANÁLISE POR MEIO DE SDS-PAGE DO PEPTÍDEO RECOMBINANTE MADURO PURIFICADO EXPRESSO EM CEPAS DE <i>P. pastoris</i> GS115 E KM71H... .....	74
FIGURA 27: Avaliação da viabilidade celular por Azul de Trypan após tratamento com o peptídeo recombinante em sua forma madura (U2-SCTX-Li1b) na linhagem celular N2A de neuroblastoma murino.....	76



FIGURA 28: Avaliação da viabilidade celular por Azul de Trypan após tratamento com o peptídeo recombinante em sua forma madura (U2-SCTX-Li1b) na linhagem celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano. ....	76
FIGURA 29: Predição estrutural entre os peptídeos U2-SCTX-Li1b e LiTx3. ...	78
FIGURA 30: Análise eletroforética do produto de amplificação da sequência do peptídeo U2-SCTX-S5Y em gel de agarose 1,5%. ....	79
FIGURA 31: Análise do perfil eletroforético do PCR de colônia referente ao peptídeo U2-SCTX-S5Y em gel de agarose 1,5%. ....	79
FIGURA 32: Análise por meio de SDS-PAGE 18% da expressão e da purificação do peptídeo U2-SCTX-S5Y expresso em <i>Pichia pastoris</i> X33. ....	80
FIGURA 33: Análise por meio de Western Blotting (utilizando os anticorpos anti-histag e anti- Myc) do peptídeo U2-SCTX-S5Y purificado expresso em <i>Pichia pastoris</i> X33. ....	81
FIGURA 34: Avaliação da viabilidade celular por Azul de Trypan após tratamento com o peptídeo recombinante mutado (U2-SCTX-S5Y) na linhagem celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano.....	82
FIGURA 36: Análise por meio de SDS-PAGE 18% da expressão e da purificação do peptídeo U2-SCTX-N-his expresso em <i>Pichia pastoris</i> X33.....	84
FIGURA 37: Análise através de Western Blotting do peptídeo U2-SCTX-S5Y N-his purificado expresso em <i>Pichia pastoris</i> X33. ....	85
FIGURA 38: Análise por meio de SDS-PAGE 18% da expressão e da purificação do peptídeo U2-SCTX-N-his expresso em <i>Pichia pastoris</i> KM71H. ....	86
FIGURA 39: Análise através de Western Blotting do peptídeo U2-SCTX-N-his purificado expresso em <i>Pichia pastoris</i> KM71H. ....	87
FIGURA 40: Avaliação da viabilidade celular por Azul de Trypan após tratamento com o peptídeo recombinante em sua forma madura (U2-SCTX-Li1b) na linhagem celular N2A de neuroblastoma murino.....	88
FIGURA 41: Análise por meio de SDS-PAGE 15% da deglicosilação do peptídeo U2-SCTX-N-his. ....	89

## SUMÁRIO

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
IDENTIFICAÇÃO E BIOLOGIA DAS ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i> .....	4
VENENO LOXOSCÉLICO .....	5
PEPTÍDEOS DA FAMÍLIA ICK OU NOTINAS.....	9
NOTINAS EM VENENO DE <i>L. intermedia</i> .....	14
CAPÍTULO I – IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS DA FAMÍLIA ICK EM ARANHAS DO GÊNERO <i>LOXOSCELES</i> .....	18
1 INTRODUÇÃO .....	18
2 OBJETIVOS.....	20
Objetivo Geral .....	20
Objetivos Específicos .....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
Obtenção Dos Venenos Loxoscélicos.....	21
Eletroforese Em Gel Desnaturante De Poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	21
Imunoensaio De Reatividade Cruzada Com Antivenenos.....	21
Obtenção Das Glândulas Produtoras De Veneno de <i>L. intermedia</i> , <i>L. gaucho</i> e <i>L. laeta</i> E Extração Do RNA Total .....	22
Quantificação E Análise Da Integridade Do RNA Total Extraído.....	23
Desenho Dos <i>Primers</i> Para A Amplificação Dos Peptídeos ICK.....	23
Transcrição Reversa Acoplada À Reação Em Cadeia Da Polimerase (RT-PCR) ..	24
Amplificação De Sequências Correspondentes Aos Peptídeos ICK DE <i>L. gaucho</i> E <i>L. laeta</i> .....	25
Clonagem Dos Produtos Amplificados Em Vetor De pGEM-T Easy Vector .....	26
Transformação Das Construções Em Bactérias Por Eletroporação .....	26
PCR De Colônia .....	27
Minipreparação Plasmidial .....	27
PCR De Sequenciamento, Precipitação E Análise De Sequenciamento .....	28
4 RESULTADOS .....	30
Perfil Proteico Eletroforético Dos Venenos De <i>L. intermedia</i> , <i>L. gaucho</i> E <i>L. laeta</i> Em SDS-PAGE.....	30
Reatividade Imunológica Cruzada De Um Peptídeo ICK Recombinante E Antivenenos De Diferentes Espécies De Aranhas Do Gênero <i>Loxosceles</i> .....	30
Rastreamento De Sequências Codificantes De Peptídeos ICK Em <i>L. gaucho</i> E <i>L. laeta</i> .....	31

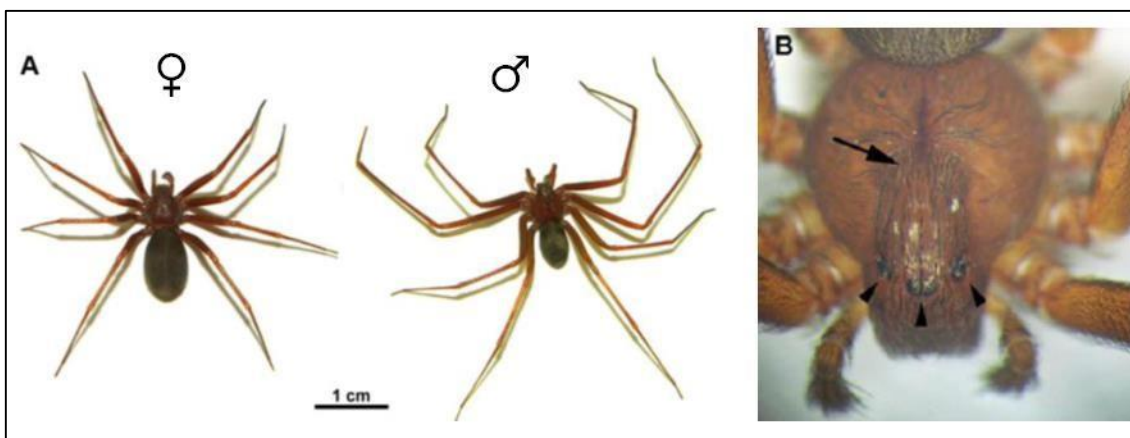
5 DISCUSSÃO .....	41
<b>CAPÍTULO II - CLONAGEM MOLECULAR, EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM PICHIA PASTORIS E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE UM PEPTÍDEO ICK PRESENTE NO VENENO DE <i>L. INTERMEDIA</i> .....</b>	<b>50</b>
1 INTRODUÇÃO .....	50
2 OBJETIVOS.....	53
OBJETIVO GERAL.....	53
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	53
3 METODOLOGIA .....	54
Clonagem Das Diversas Formas Do Peptídeo U2-SCTX-Li1b Em Vetor De Expressão Em <i>Pichia pastoris</i> pPICZαC.....	54
Transformação Das Construções U2-SCRTX-S5Y/ pPICZαC Em <i>E. coli</i> TOP10F' Por Eletroporação .....	56
PCR De Colônia .....	56
Miniprep, PCR De Sequenciamento E Sequenciamento Dos Insertos .....	57
Subclonagem Das Construções inserto/pPICZαC Em <i>Pichia pastoris</i> .....	57
Teste De Expressão Dos Peptídeos Em <i>Pichia pastoris</i> X33 .....	58
Expressão Do Peptídeo Recombinante Em <i>Pichia Pastoris</i> .....	59
Purificação Dos Peptídeos Recombinantes Por Cromatografia De Afinidade Em Resina De Ni-NTA Agarose.....	61
Eletroforese De Proteínas Em Gel Desnaturante De Poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	62
Dosagem De Proteínas .....	62
Imunoensaios De <i>Western Blotting</i> .....	63
Ensaio De Deglicosilação Do Peptídeo U2-SCTX-S5Y .....	63
Ensaio De Atividade Inseticida .....	64
Cultivo Celular E Ensaio De Viabilidade Com Azul De Trypan .....	64
4 RESULTADOS .....	67
5 DISCUSSÃO .....	90
CONCLUSÃO .....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	102
ANEXOS .....	116



## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### IDENTIFICAÇÃO E BIOLOGIA DAS ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* são enquadradas dentro da família Sicariidae, sub-ordem Araneomorphae, ordem Araneae, classe Arachnida, subfilo Chelicerata e filo Arthropoda (PLATNICK, 2013). Essas aranhas são popularmente conhecidas como aranhas-marrons, devido à sua coloração característica, ou como aranhas-violino, por apresentarem uma marca semelhante a esse instrumento na superfície dorsal do cefalotórax (Figura 1A e 1B) (DA SILVA *et al.*, 2004; GREMSKI *et al.*, 2014). Outro método consistente de identificação das aranhas-marrons é o padrão dos olhos: elas exibem 6 olhos arranjados em pares sobre o cefalotórax, em uma disposição em semicírculo característica deste gênero (Figura 1B) (APPEL *et al.*, 2005; GREMSKI *et al.*, 2014).



**FIGURA 1: IDENTIFICAÇÃO DAS ARANHAS-MARRONS (GÊNERO *Loxosceles*).** (A) Espécimes adultos de *L. intermedia* – uma fêmea, à esquerda, e um macho, à direita. (B) Em detalhe, desenho de violino sobre o cefalotórax (seta) e disposição característica dos olhos em pares formando um semicírculo (cabeças de setas), característico de aranhas do gênero *Loxosceles*. Adaptado de: CHAIM *et al.*, 2011.

As aranhas *Loxosceles* são pequenas, apresentando comprimento corporal médio que varia de 1 a 5 cm, incluindo as pernas (CHAIM *et al.*, 2011). Apresentam acentuado dimorfismo sexual, sendo que as fêmeas, normalmente, apresentam corpo maior e pernas mais curtas que os machos (Figura 1B) (DA SILVA *et al.*, 2004). Ambos os sexos são venenosos, mas acredita-se que em

acidentes com humanos, o efeito tóxico do veneno das fêmeas é mais intenso, uma vez que estas produzem uma quantidade maior de veneno (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

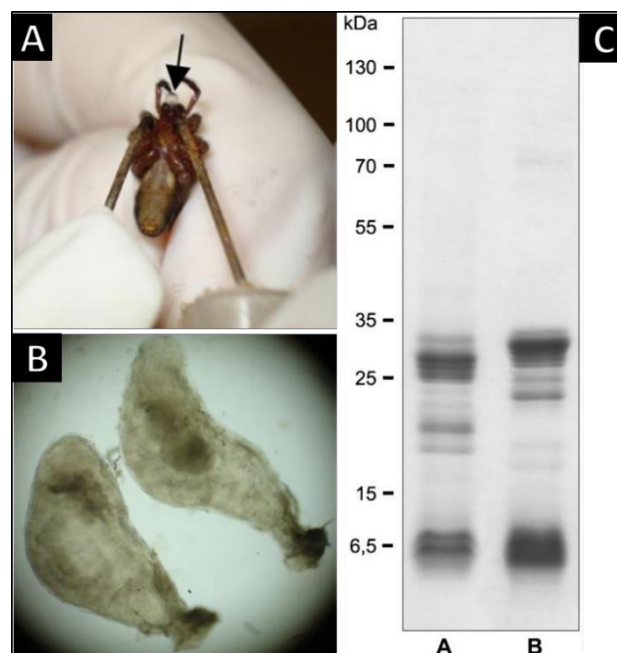
O gênero *Loxosceles* é amplamente distribuído pelo mundo, estando presente nas Américas, Europa, África, Ásia e Oceania (da SILVA *et al.*, 2004). Possui mais de 100 espécies que têm como centro de origem a África e as Américas (MARQUES-DA-SILVA; FISCHER, 2005). Atualmente, verifica-se a existência de 12 espécies de aranha-marrom no Brasil (GREMSKI *et al.*, 2014), sendo que quatro dessas espécies registradas estão presentes no estado Paraná: *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. hirsuta* (FISCHER; VASCONCELLOS-NETO, 2005; MARQUES-DA-SILVA; FISCHER, 2005).

As aranhas-marrons são sedentárias e possuem hábitos noturnos (ANDRADE *et al.*, 1999), alimentando-se de pequenos insetos e servindo de alimento para anfíbios, répteis e aves. Ao atingirem um ano de vida, adquirem maturidade sexual (FISCHER, 1996). Apresentam grande tolerância a temperaturas extremas e são encontradas em regiões frias e desérticas (FISCHER; VASCONCELLOS-NETO, 2005). Em habitat natural podem ser encontradas em lugares escuros como, por exemplo, em telhas empilhadas, em entulhos, em cavidades de rochas e em restos de vegetais. No ambiente intradomiciliar, essas aranhas podem ser encontradas atrás de quadros, sob a mobília, em gavetas e entre as roupas. Costumam se adaptar a lugares sombrios e com pouca higiene (FUTRELL, 1992; FISCHER; VASCONCELLOS-NETO, 2005). Essas aranhas não são agressivas e a maior incidência de acidentes com o homem deve-se ao fato da aranha marrom ter adquirido hábitos intradomiciliares. Grande parte dos acidentes ocorre quando as pessoas comprimem inadvertidamente a aranha ao vestir-se, enxugar-se ou durante o sono, ocorrendo a picada no homem apenas como forma de defesa (FUTRELL, 1992; RIBEIRO *et al.*, 1993).

## **VENENO LOXOSCÉLICO**

O veneno loxoscélico consiste em um líquido incolor e cristalino, produzido por um par de glândulas situadas no cefalotórax da aranha e que se comunicam com o exterior através do aparelho inoculador constituído por um par de

quelíceras (Figura 2A e 2B) (dos SANTOS *et al.*, 2000; da SILVEIRA *et al.*, 2002). O volume de veneno produzido pelas glândulas é variável de acordo com o animal (tamanho, sexo e outros fatores), mas dificilmente ultrapassa poucos microlitros e contém de 20 µg a 200 µg de proteínas totais (SAMS *et al.*, 2001; BINFORD; WELLS, 2003). O conteúdo total do veneno loxoscélico ainda não é totalmente esclarecido, embora diversos estudos tenham comprovado que sua composição bioquímica consiste em uma mistura complexa de compostos biologicamente ativos, essencialmente proteínas, com ação tóxica e/ou enzimática. Em análises eletroforéticas, verifica-se a predominância de proteínas de baixa massa molecular (5-35 kDa) em detrimento das proteínas de alta massa molecular, as quais são bem menos expressas (Figura 3C) (VEIGA *et al.*, 2000; da SILVEIRA *et al.*, 2002; GREMSKI *et al.*, 2010, 2014). Acredita-se que a toxicidade do veneno da aranha esteja associada ao efeito combinado ou sinérgico de seus constituintes (da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005).



**FIGURA 2: VENENO DE ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles*.** (A) Gotícula de veneno (seta) sendo coletada a partir de um espécime de *L. intermedia* submetido a eletrochoque; (B) Glândulas produtoras de veneno de *L. intermedia* vistas ao microscópio estereoscópico (40X); (C) Perfil eletroforético do veneno de *L. intermedia* (SDS-PAGE 8-18%). Nota-se a predominância de toxinas de baixa massa molecular (5-35 kDa); A – amostra não-reduzida e B – amostra reduzida. Adaptado de: CHAIM *et al.*, 2011; GREMSKI *et al.*, 2010.

Diversas toxinas do veneno loxoscélico têm sido identificadas e caracterizadas do ponto de vista bioquímico, biológico e estrutural. O transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* realizado identificou sequências codificantes de vários grupos de toxinas, a exemplo de peptídeos da família das notinas (55,9%), fosfolipases-D (20,2%), metaloproteases da família das astacinas (22,6%), serinoprotease (0,5%), proteína tumoral controlada traducionalmente (0,4%), alérgeno (0,2%), inibidor de serinoprotease (0,1%) e hialuronidase (0,1%).

As toxinas mais bem caracterizadas são as fosfolipases-D (CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006; 2007a; APPEL *et al.*, 2008, VUITIKA *et al.*, 2013), metaloproteases, (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010; FEITOSA *et al.*, 1998; da SILVEIRA *et al.*, 2007b) e hialuronidases (FERRER *et al.*, 2013; da SILVEIRA *et al.*, 2007c).

A família de proteína mais estudada dos venenos loxoscélicos é a das toxinas dermonecróticas ou fosfolipases-D. Essas proteínas possuem massa molecular de, aproximadamente, 30 a 35 kDa, e estão associadas com a maioria dos efeitos deletérios decorrentes do envenenamento por aranhas *Loxosceles*. Estudos com fosfolipases-D nativas e recombinantes já mostraram que essas toxinas são capazes de induzir citotoxicidade em células em cultura, edema, ativação de citocinas, letalidade em camundongos, dermonecrose, hemólise, nefrotoxicidade, resposta inflamatória, agregação plaquetária e aumento da permeabilidade vascular (CHAIM *et al.*, 2011; da SILVEIRA *et al.*, 2006, 2007a; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; APPEL *et al.*, 2008; VUITIKA *et al.*, 2013). Análises estruturais e das sequências primárias das fosfolipases-D revelam que essas toxinas apresentam resíduos de aminoácidos conservados em seus sítios catalíticos e estudos com isoformas recombinantes mutadas revelam que a atividade dessas toxinas é dependente da atividade catalítica das mesmas. O mecanismo de ação das fosfolipases-D ainda não é totalmente compreendido, mas evidências experimentais sugerem que a hidrólise de fosfolipídios acaba por gerar mediadores (ácido lisofosfatídico e ceramida-1-fosfato, por exemplo) que atuam como sinais para determinadas vias metabólicas, desencadeando efeitos patofisiológicos (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; KUSMA *et al.*, 2008; GREMSKI *et al.*, 2014).



Outra família de toxinas identificadas em venenos loxoscélicos é a família das metaloproteases (da SILVEIRA *et al.*, 2007b; TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010). Estas toxinas foram primeiramente descritas no veneno de *L. intermedia* por Feitosa e colaboradores (1998), sendo caracterizadas como moléculas de baixa massa molecular com atividade fibronectinolítica e fibrinogenolítica (20-28 kDa) e gelatinolítica (32-35 kDa). A atividade dessas metaloproteases está possivelmente relacionada a distúrbios hemostáticos, tais como hemorragia da derme, injúria de vasos sanguíneos e como um fator de espalhamento gravitacional (característico do loxoscelismo) e sistêmico, facilitando a penetração dos outros componentes do veneno (ZANETTI *et al.*, 2002; da SILVEIRA *et al.*, 2007b; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Da Silveira e colaboradores (2007b) caracterizaram uma isoforma de metaloprotease da família das astacinas (LALP, *Loxosceles Astacin-Like Protease*) presente no veneno de *L. intermedia* e outras 2 isoformas (LALP2 e LALP3) foram recentemente identificadas por Trevisan-Silva e colaboradores (2010). Este último trabalho também identificou a presença de metaloproteases da família das astacinas no veneno de *L. gaucho* e *L. laeta*, indicando que essas moléculas constituem uma família conservada entre as espécies do gênero.

Outra toxina descrita em venenos loxoscélicos é a hialuronidase. As hialuronidases são conhecidas como “fator de espalhamento gravitacional” e sua presença pode ser potencializadora de outros componentes do veneno no sentido de facilitar a penetração destes na corrente sanguínea e em vários tecidos (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Em *L. intermedia*, foram identificadas duas prováveis isoformas de hialuronidases com massas de 41 e 43 kDa, as quais foram capazes de degradar ácido hialurônico e condroitin-sulfato, respectivamente (da SILVEIRA *et al.*, 2007c). Ferrer e colaboradores (2013) recentemente obtiveram uma hialuronidase recombinante de *L. intermedia*, capaz de degradar os mesmos substratos antes relatados, e que potencializou os efeitos dermonecróticos promovidos pelas fosfolipases-D em experimentos conduzidos em coelhos.

Uma proteína pertencente à família TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) do veneno de *L. intermedia* também já foi caracterizada. Essa toxina foi capaz de induzir edema em patas de camundongo e também permeabilidade microvascular em vasos da pele, sendo que este último efeito

apresentou padrão diferente em relação ao que é induzido pelo veneno total de *L. intermedia* (SADE *et al.*, 2012).

Acredita-se que a toxicidade do veneno da aranha esteja associada ao efeito combinado ou sinérgico de seus constituintes (GEREN *et al.*, 1976; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos nocivos ocasionados por muitas toxinas. Dessa forma, torna-se importante a identificação e o estudo das atividades biológicas geradas por cada um dos componentes do veneno isoladamente.

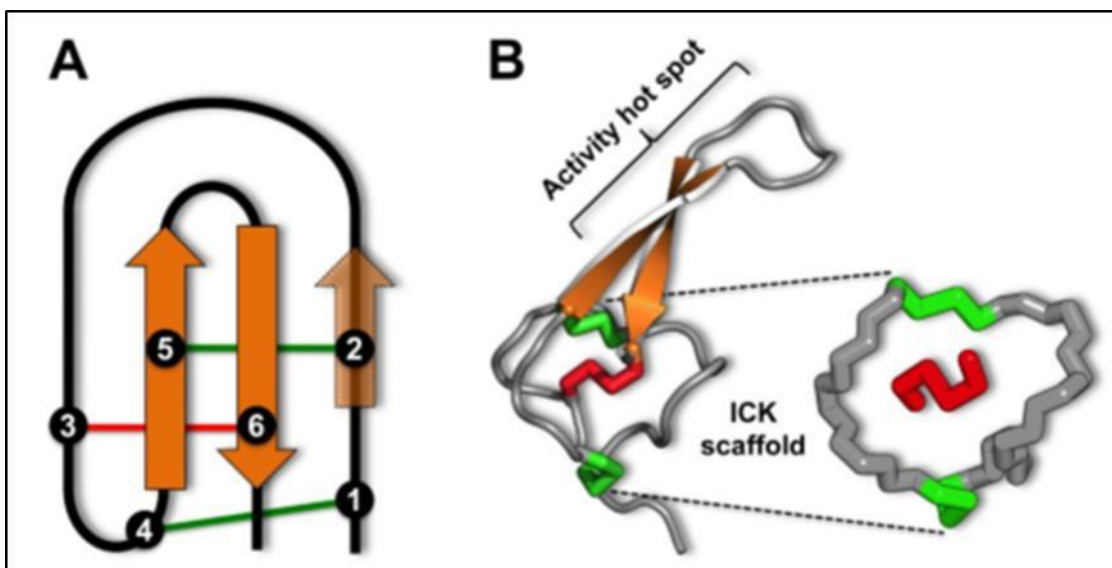
## PEPTÍDEOS DA FAMÍLIA ICK OU NOTINAS

Em termos evolutivos, as aranhas são os animais predadores mais bem-sucedidos e mantêm o maior “pool” de peptídeos tóxicos (SOLLOD *et al.*, 2005). Tais peptídeos são considerados os principais componentes dos venenos de aranhas e, juntamente com as acilpoliaminas, parecem representar o seu principal arsenal tóxico (ESCOUBAS; DIOCHOT; CORZO, 2000).

Apesar do maior conjunto de peptídeos tóxicos, os venenos de aranhas têm sido muito menos estudados em relação aos venenos de outros animais. Poucos estudos têm examinados os mecanismos genéticos subjacentes pelos quais as aranhas geram essa diversidade de peptídeos em seus venenos. Sollod e colaboradores (2005) sugerem, a partir de dados obtidos em trabalhos com aranhas australianas da família Hexathelidae (“funnel-web spiders”), que as aranhas, assim como os escorpiões e caramujos marinhos (“cone snails”), têm diversificado seu repertório de peptídeos tóxicos pela duplicação de genes ancestrais seguido de mutações nos *loci* relacionados à toxina madura.

A análise das mais de 500 sequências aminoacídicas e das, aproximadamente, 30 estruturas tridimensionais de peptídeos de aranhas já descritas demonstram que esses peptídeos apresentam tipicamente massa que varia de 3 a 10 kDa e um alto número de resíduos de cisteína em sua estrutura primária. Na grande maioria dos peptídeos presentes nos venenos de aranhas, muitos desses resíduos estabelecem pontes dissulfeto intracadeia, as quais se organizam de forma a compor um motivo estrutural denominado “nó de cistina inibidor”, ICK (Inhibitor Cystine Knot) (Figura 3) (MAGGIO *et al.*, 2004; FERRAT; DARBON, 2005; VASSILEVSKI; KOZLOV; GRISHIN, 2009). Esse motivo é

caracterizado por cadeias  $\beta$  anti-paralelas estabilizadas por um nó de cistina, o qual compreende um anel formado por duas pontes dissulfeto que são cruzadas por uma terceira, criando uma espécie de nó na estrutura do peptídeo (Figura 3) (CRAIK; DALY; WAINE, 2001). Devido a essa conformação, os peptídeos ICK são também denominados notinas (do inglês, “knottins”, nó).

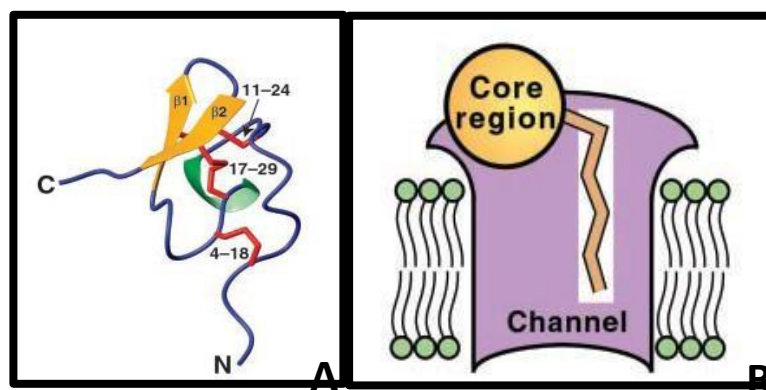


**FIGURA 3: Esquema do motivo estrutural Nó de Cistina Inibidor (ICK).** (A) O motivo nó de cistina inibidor compreende as folhas  $\beta$  antiparalelas (setas laranjas) estabilizadas por um “nó” estabelecido pelas pontes dissulfeto intramoleculares (linhas verdes e vermelha) formadas pelos resíduos de cisteína (numerados de 1 a 6). (B) O nó de cistina é composto por um anel formado por duas pontes dissulfeto (em verde) e por seções intermediárias do esqueleto polipeptídico (em cinza), inter cruzados por uma terceira ponte dissulfeto (em vermelho) que atravessa o anel para criar um pseudo nó. Adaptado de: SAEZ *et al.*, 2010.

As notinas são toxinas muito estudadas e exercem seus efeitos por meio da interação com canais iônicos e receptores específicos presentes nas junções neuromusculares e/ou sinapses do sistema nervoso central de insetos, causando paralisia. Embora dados farmacológicos ainda sejam escassos, toxinas inseticidas de artrópodes parecem afetar principalmente canais de sódio e cálcio. Entretanto, notinas atuando em canais de potássio também já foram descritas (de LIMA *et al.*, 2007).

Os canais de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dependentes de voltagem constituem um dos alvos para algumas notinas produzidas por aranhas. Esses canais permitem a entrada do  $\text{Ca}^{2+}$  na célula, em resposta à despolarização da membrana, de forma

que esses íons possam exercer suas funções sobre processos fisiológicos específicos, tais como a secreção de neurotransmissores (BELEBONI *et al.* 2004). Branton e colaboradores (1987) isolaram uma notina da aranha *Plecteurys tristis*, denominada PLTX-II, a qual demonstrou em ensaios eletrofisiológicos ser capaz de bloquear irreversivelmente canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem do terminal pré-sináptico da junção neuromuscular de *Drosophila*. Esse bloqueio impede a entrada de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e a consequente liberação de neurotransmissores, levando à paralisia. Os mesmos resultados descritos acima foram obtidos por meio de estudos com uma notina da aranha *Hololena curta*, em neurônios de *Drosophila* cultivados *in vitro* (LEUNG *et al.*, 1989). Concentrações nanomolares da notina  $\omega$ -ACTX-Hv2a (Figura 4A e 4B) isoladas a partir do veneno da aranha australiana *Hadronyche versuta* foram capazes de inibir correntes através de canais de cálcio em neurônios de *Apis mellifera* de forma praticamente irreversível, evidenciando grande potencial como antagonistas desse tipo de canal (WANG *et al.*, 2001). Estudos envolvendo a toxina Huwentoxina-V, purificada de forma nativa a partir do veneno da aranha *Ornithoctonus huwena*, mostraram que esta toxina foi capaz de inibir canais de cálcio voltagem-dependentes de neurônios dorsais isolados de baratas de forma tempo e concentração-dependentes (DENG *et al.*, 2008).



**FIGURA 4:  $\omega$ -ACTX-Hv2a – Notina de *Hadronyche versuta*.** (A) Estrutura molecular. Em amarelo, as duas cadeias betas antiparalelas que são estabilizadas pelo nó de cistina, composto pelas pontes dissulfeto (em vermelho). Os números indicam a posição relativa dos resíduos de cisteínas que compõem as pontes dissulfeto na estrutura primária do peptídeo. (B) Modelo hipotético do mecanismo de ação de  $\omega$ -ACTX-Hv2a com o canal de cálcio dependente de voltagem. Adaptado de: WANG *et al.*, 2001.

Os canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ) dependentes de voltagem medeiam o aumento

da condutância ao  $\text{Na}^+$  durante a rápida fase de despolarização do potencial de ação. Dessa forma, esse canal representa um elemento estrutural chave que controla a excitabilidade celular em sistemas biológicos. Não é surpreendente, portanto, que esse tipo de canal seja alvo de uma variedade de toxinas de animais que os auxilia no combate a predadores ou na captura de suas presas (NICHOLSON, 2007). Várias toxinas isoladas a partir de venenos de aranhas já foram caracterizadas como antagonistas de canais de sódio dependente de voltagem. Corzo e colaboradores (2000) isolaram e caracterizaram 4 notinas presentes no veneno de *Paracoelotes luctuosos*. Essas notinas foram denominadas  $\delta$ -palutoxinas IT1 até IT4. Ensaio biológicos de microinjeção em larvas de *Spodoptera litura* revelaram alta toxicidade dessas toxinas para insetos. Ensaio eletrofisiológicos com  $\delta$ -palutoxina IT1 sintética forneceram indícios de que essas notinas atuam *in vivo* retardando a inativação de canais de  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem durante o potencial de ação, resultando em alta letalidade. Nottinas isoladas a partir do veneno de *Agelenopsis aperta*, denominadas  $\mu$ -agatoxinas, apresentam atividade biológica semelhante às  $\delta$ -palutoxinas de *P. luctuosos*, aumentando o influxo de sódio por retardar a inativação dos canais de  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem. Em experimentos com larvas de *Manduca sexta* (SKINNER *et al.*, 1989) e *Musca domestica* (ADAMS *et al.*, 1989) observou-se paralisia excitatória após microinjeção de  $\mu$ -agatoxinas. Isso se deve à manutenção do influxo de  $\text{Na}^+$  por maior tempo, ocasionando maior liberação de neurotransmissores e frequência aumentada de potenciais excitatórios em motoneurônios desses insetos (SKINNER *et al.*, 1989; NICHOLSON, 2007). A partir de estudos eletrofisiológicos em axônios gigantes dissecados do cordão nervoso abdominal de baratas e sensibilizados por uma notina de *Phoneutria nigriventer*, Tx4(1-6), De Lima e colaboradores (2002) observaram a mesma manutenção prolongada do influxo de  $\text{Na}^+$  e geração de potenciais de ação repetitivos (KING *et al.*, 2008). Wang e colaboradores (2012) verificaram que a toxina Huwentoxina-I de *O. huwena*, obtida por síntese química e submetida a redobrimento *in vitro*, foi capaz de inibir correntes de  $\text{Na}^+$  em neurônios dorsais extraídos de espécimes adultos da barata *Periplaneta americana*.

Até o momento, uma única família de notinas com ação sobre canais de potássio inseto-específicos foi descrita. As J-ACTXs ("*Janus-faced*

*atracotoxins*”), extraídas de aranhas dos gêneros *Atrax* e *Hadronyche*, são neurotoxinas excitatórias que parecem atuar diretamente no sistema nervoso de insetos (TEDFORD *et al.*, 2004). Estudos conduzidos por Wang e colaboradores (2000) e por Maggio e King (2002) caracterizaram as J-ACTXs como potentes toxinas contra uma ampla gama de insetos ortópteros e dípteros. Ensaio com aplicação direta da notina J-ACTX-Hv1c aos gânglios metatorácicos resultaram em movimentos espontâneos descoordenados das pernas de *P. americana*. A interação com canais de potássio foi confirmada em ensaios eletrofisiológicos nos quais foi verificado que J-ACTX-Hv1c bloqueia especificamente correntes de K<sup>+</sup> nos neurônios de baratas (TEDFORD *et al.*, 2004).

Muitos estudos têm mostrado que as neurotoxinas purificadas a partir de venenos apresentam alta especificidade a animais pertencentes a diversos filos. A existência de componentes tóxicos distintos com especificidade sobre mamíferos e insetos foi primeiramente mostrada em venenos de *Latrodectus tredecimguttatus* (viúva-negra) (FRONTALI; GRASSO, 1964) e mais tarde em venenos dos escorpiões *Leiurus quinquestriatus* e *Andrictinus australis* (ZLOTKIN *et al.*, 1972). Esses trabalhos discriminaram peptídeos com letalidade em camundongos e peptídeos com atividade biológica sobre insetos. Algumas proteínas, entretanto, foram caracterizadas como tóxicas ou apresentaram atividades farmacológicas sobre mais de um grupo de animais, não exibindo estrita especificidade (de LIMA *et al.*, 2007). Assim, muitas notinas isoladas dos venenos de aranhas apresentam amplo espectro de ação sobre o sistema nervoso de mamíferos, por exemplo. Isso se deve às homologias existentes entre os canais iônicos/receptores de invertebrados e vertebrados (ESTRADA; VILLEGAS; CORZO, 2007).

Muitos estudos caracterizaram a ação de peptídeos do tipo notina de aranhas em mamíferos. Guatimosin e colaboradores (1997) demonstraram que as notinas Tx3-3 e Tx3-4 de *Phoneutria nigriventer* inibiram o influxo de Ca<sup>2+</sup> em sinaptossomas cerebrocorticais de ratos, sugerindo que essas toxinas são antagonistas de canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo P/Q em mamíferos. Outras toxinas de *P. Nigriventer* (Tx3-2 e Tx3-5) inibiram irreversivelmente canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo L em células pituitárias da linhagem GH3 (LEÃO *et al.*, 1997; KALAPOTHAKIS *et al.*, 1998). A notina SNX-325 presente no veneno da aranha *Segestria florentina* mostrou-se, em concentrações nanomolares, ser um bloqueador seletivo de

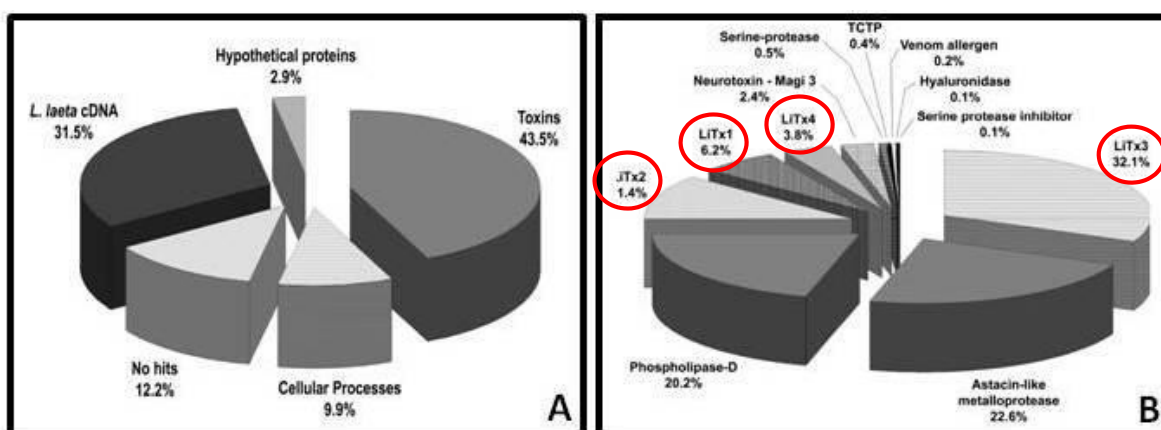
canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo N (NEWCOMB *et al.*, 1995; RASH; HODGSON, 2002). Estudos também relatam a modulação de canais de  $\text{Na}^+$  de vertebrados por notinas isoladas de venenos de aranhas. Xiao e Liang (2003), estudando a notina Hainantoxina-IV (HNTX-IV) de *Selenocosmia hainana*, mostraram por meio da técnica de *patch-clamp* que essa toxina inibia canais de  $\text{Na}^+$  sensíveis a tetrodotoxina (TTX) em neurônios de ratos. Outra notina, TRTX-Tp2a do veneno de *Thrixopelma pruriens*, foi caracterizada como antagonistas de canais de  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem por Schmalhofer e colaboradores (2008); quando injetada via intravenosa ou por administração intratecal mostrou-se letal para ratos. A literatura também relata notinas que apresentam atividade biológica sobre canais de  $\text{K}^+$  de vertebrados. Diochot e colaboradores (1999) purificaram a notina PaTx1 a partir do veneno da aranha *Phrixotrichus auratus* e verificaram que essa toxina era capaz de bloquear correntes de  $\text{K}^+$  através de canais de  $\text{K}^+$  do tipo Kv4.3 e Kv4.2 por alterar sua dinâmica de ativação/inativação; quando injetada via intravenosa em camundongos, foram verificadas numerosas reações cardíacas adversas, a exemplo de taquicardia ventricular. PaTx1 também mostrou bloquear correntes de  $\text{K}^+$  em cardiomiócitos murinos cultivados *in vitro*. Outras notinas caracterizadas como antagonistas de canais de  $\text{K}^+$  foram isoladas do veneno de *Grammostola spatulata* por Swartz e Mackinnon (1995): HaTx1 e HaTx2 foram capazes de inibir canais de  $\text{K}^+$  dependentes de voltagem de cérebro de rato expressos em oócitos de *Xenopus*.

## **NOTINAS EM VENENO DE *L. intermedia***

Em 2004, De Castro e colaboradores, por meio de várias metodologias de cromatografia, purificaram 3 peptídeos a partir do veneno total de *L. intermedia*, os quais foram denominados LiTx1, LiTx2 e LiTx3; posteriormente, a sequência de um quarto peptídeo foi depositada no *GenBank*. As toxinas purificadas apresentaram massa molecular variando de 5,6 a 7,9 kDa e atividade inseticida contra as pragas de interesse econômico *Spodoptera frugiperda* e *Spodoptera cosmioides*. Análises de similaridade de sequências indicaram que essas moléculas atuam sobre canais iônicos específicos de membranas do sistema nervoso de insetos (de CASTRO *et al.*, 2004; GREMSKI *et al.*, 2010); essas análises de similaridade sugeriram que o peptídeo LiTx3 teria como alvo canais

de sódio voltagem-dependentes, ao passo que para os peptídeos LiTx1 e LiTx2, não foi possível indicar se atuavam em canais de sódio ou canais de cálcio voltagem-dependentes. Os autores realizaram também a clonagem dos peptídeos e verificaram que estes continham muitos resíduos de cisteína (10, ao todo) e eram sintetizados como moléculas precursoras, contendo um peptídeo-sinal, um propeptídeo e uma cadeia madura.

Mais tarde, com o propósito de determinar o perfil de moléculas expressas, Gremski e colaboradores (2010) produziram o transcriptoma da glândula de veneno da aranha-marrom *L. intermedia*. Este estudo revelou que 43,5% das ESTs (*“Expression Sequence Tags”*) anotadas eram codificadoras de toxinas (Figura 5A). Entre essas sequências relativas a toxinas, verificou-se a predominância de transcritos relacionados com os peptídeos descritos por De Castro e colaboradores (2004), perfazendo 53,5% das ESTs anotadas. Gremski e colaboradores (2010), diante das características dos peptídeos e em consonância com a literatura, adotaram a classificação desses peptídeos como notinas ou peptídeos ICK. As análises das sequências revelaram que os transcritos referentes ao peptídeo LiTx3 foram os mais abundantes, representando 13,9% de todas as ESTs anotadas (Figura 6). Tomando como referência somente as sequências codificadoras de toxinas, 32% apresentaram similaridade com LiTx3; 11,4%, 6,2% e 3,8% das ESTs anotadas estavam relacionadas aos peptídeos LiTx2, LiTx3 e LiTx4, respectivamente (Figura 5B).



**FIGURA 5: TRANSCRIPTOMA DE *L. intermedia*.** (A) Porcentagens dos transcritos agrupados de acordo com suas classes. (B) Proporções relativas de cada grupo de toxinas em relação ao total de transcritos codificadores de toxinas gerados. Adaptado de: GREMSKI *et al.*, 2010.



Matsubara e colaboradores (2013) produziram o primeiro peptídeo ICK recombinante derivado de aranhas do gênero *Loxosceles*. Este peptídeo, denominado U2-SCTX-Li1b, apresenta alta homologia com o peptídeo LiTx3 descrito por De Castro e colaboradores (2004) e com outras prováveis isoformas de LiTx3 obtidas no estudo do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia*.

Tendo em vista a propriedade das notinas de interagir com canais iônicos, torna-se clara a potencial utilização dessas toxinas em estudos estruturais e funcionais sobre esses canais, bem como o mapeamento de sítios específicos que podem ser de interesse como alvo para novas drogas. Além disso, o fato de muitas notinas serem inseto-específicas permite explorá-las como possíveis insumos no desenvolvimento de bioinseticidas para o controle de pragas de interesse econômico ou insetos vetores de doenças.

Dessa forma, este trabalho visa contribuir com os estudos acerca dos peptídeos da família das notinas, dada a grande representatividade dessas moléculas verificada por meio do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* e a escassez de dados na literatura, bem como o potencial de emprego dessas moléculas para fins biotecnológicos e terapêuticos.

**CAPÍTULO I IDENTIFICAÇÃO DE  
PEPTÍDEOS DA FAMÍLIA ICK EM  
ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles***

# **CAPÍTULO I – IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS DA FAMÍLIA ICK EM ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles***

## **1 INTRODUÇÃO**

O veneno é uma importante aquisição evolutiva para as aranhas por possibilitar a defesa contra os predadores e, sobretudo, por permitir a imobilização e/ou morte das presas para fins de alimentação (WINDLEY *et al.*, 2012; VASSILEVSKI *et al.*, 2009). Para a realização das tarefas citadas, o processo evolutivo selecionou uma ampla gama de moléculas tóxicas nos venenos das aranhas. Uma classe importante de toxinas de aranhas associadas à função de predação e defesa são os peptídeos da família ICK (KING *et al.*, 2013; DALY; CRAIK, 2011).

Os peptídeos ICK são assim chamados por conter em sua estrutura um motivo denominado “Inhibitor Cystine Knot” (do inglês, nó de cistina inibidor), o qual é composto por duas ou três folhas- $\beta$  antiparalelas estabilizadas por três pontes dissulfeto intramoleculares (NORTON; PALLAGHY, *et al.*, 1994; CRAIK *et al.*, 2001). Em geral, esses peptídeos são neurotoxinas que atuam em alvos presentes no sistema nervoso de diferentes animais, entre eles insetos e mamíferos. Devido à atuação em canais iônicos e receptores celulares, os peptídeos ICK têm sido extensivamente estudados para a compreensão de seus mecanismos moleculares básicos (dinâmica de ativação/inativação de canais iônicos, por exemplo) e para a geração de produtos biotecnológicos com aplicações agrícolas (bioinseticidas, por exemplo) e terapêuticas (drogas analgésicas, por exemplo) (ACKERMAN *et al.*, 2014; SAEZ *et al.*, 2010).

As aranhas são consideradas um grupo animal notável devido à grande diversidade de peptídeos tóxicos produzidos em suas glândulas de veneno. Tal diversidade molecular está relacionada com variações estruturais conformacionais sutis e nas superfícies de interação resultantes, muitas vezes atribuídas à modificação de um único resíduo de aminoácido. Por consequência, o conhecimento a respeito da diversidade estrutural e farmacológica desses peptídeos é bastante limitado, uma vez que o número de peptídeos identificados é incrivelmente alto, podendo ser de até 1000 peptídeos diferentes em um

mesmo veneno (GREMSKI *et al.*, 2010; KING *et al.*, 2008; SOLLOD *et al.*, 2005; ESCOUBAS *et al.*, 2000).

A literatura a respeito dos peptídeos ICK em aranhas do gênero *Loxosceles* é bastante escassa. De Castro e colaboradores (2004) identificaram pela primeira vez esses peptídeos a partir do veneno de *L. intermedia*. Três peptídeos, denominados LiTx1, LiTx2 e LiTx3, foram purificados a partir do veneno bruto e foram caracterizados como tóxicos por promoverem a morte de insetos-pragas de interesse econômico. Posteriormente, a sequência de outro peptídeo, LiTx4, foi depositada nos bancos de dados, entretanto, esse peptídeo ainda não foi caracterizado do ponto de vista biológico. O estudo do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* revelou ainda um grande número de transcritos relacionados a peptídeos ICK (53,5% dos transcritos referentes a toxinas obtidos), de todos os grupos até então descritos (LiTx1-4) (GREMSKI *et al.*, 2010). Em 2013, Matsubara e colaboradores obtiveram o primeiro peptídeo ICK recombinante de *L. intermedia* expresso em modelo procariótico; tal peptídeo recombinante apresenta alta homologia com o peptídeo LiTx3 descrito por De Castro e colaboradores (2004).

Abordagens de rastreamento de sequências codificantes de toxinas a partir do RNA extraído das células da glândula produtora de veneno podem fornecer um panorama geral dos transcritos com informações a respeito de uma determinada família de moléculas. Os resultados possuem um importante valor preditivo de grupos de toxinas farmacológica e biologicamente distintos nos venenos e contribuem para o entendimento das relações evolutivas das toxinas de aranhas baseadas em diferentes aspectos: na diversificação das sequências de cDNA, na estrutura primária de precursores de peptídeos, na estrutura tridimensional de motivos específicos e nas funções biológicas (JIANG *et al.*, 2008). Assim, este capítulo teve como objetivo rastrear sequências codificantes de peptídeos ICK em duas outras espécies de aranhas do gênero *Loxosceles*, *L. gaucho* e *L. laeta*, a partir do RNA extraído das respectivas glândulas de veneno, uma vez que nada a respeito desses peptídeos nessas espécies foi relatado na literatura até o presente momento.

## 2 OBJETIVOS

### Objetivo Geral

- Identificar a presença de peptídeos ICK no veneno de aranhas das espécies *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles laeta* por meio de imunoenaios e análise de transcritos produzidos nas glândulas produtoras de veneno dessas aranhas.

### Objetivos Específicos

- Avaliar a reatividade cruzada entre um peptídeo ICK recombinante e os soros hiperimunes anti-*L. gaucho* e anti-*L. laeta*;
- Rastrear transcritos codificantes de peptídeos ICK a partir de RNA extraído de glândulas de veneno de *L. gaucho* e *L. laeta*;
- Comparar as sequências dos peptídeos ICK encontrados em *L. gaucho* e *L. laeta* com as sequências descritas para peptídeos ICK de *L. intermedia*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### Obtenção Dos Venenos Loxoscélicos

O veneno de *L. intermedia* foi obtido de aranhas adultas na cidade da Lapa-PR (Certificado IBAMA, em anexo). Após a captura, as aranhas foram mantidas em laboratório com troca de água semanal e alimentação mensal com tenébrios. Após duas semanas sem alimentação (para evitar contaminação com egesta) as aranhas foram submetidas à eletrochoque de 15V no cefalotórax (FEITOSA *et al.*, 1998), a gotícula cristalina de veneno foi coletada das quelíceras com micropipeta, solubilizada em PBS (NaCl 100mM; Tampão Fosfato de Sódio 10mM; pH 7,3) e mantida em gelo até o final da coleta. Os venenos de *L. laeta* e *L. gaucho* foram gentilmente cedidos pelo CPPI, Prof. Dr. João Carlos Minoso e Msc. Isolete de Pauli. Os venenos das três espécies foram dosados por meio do microensaio adaptado de Bradford (BRADFORD, 1976), diluídos com PBS para concentração final de 2 mg/mL, aliquotados em 50 µL e armazenados a -20°C.

#### Eletroforese Em Gel Desnaturante De Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Amostras de veneno extraído das glândulas de veneno de *L. gaucho* e *L. laeta* (5 ug) foram submetidas à eletroforese em gel gradiente (10-20%) de poliacrilamida com SDS (dodecil sulfato de sódio), sob condições redutoras (5% β-mercaptoetanol). A corrida eletroforética foi realizada com amperagem constante de 25 mA e para detecção de proteínas, o gel foi corado por 5 minutos com Azul Brilhante de Coomassie 0,02% (p/v) (dissolvido em metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e água deionizada quantidade suficiente para completar 100% (v/v)) e, em seguida, descorado com metanol 50% (v/v).

#### Imunoensaio De Reatividade Cruzada Com Antivenenos

Amostras do peptídeo ICK de *L. intermedia* U2-SCTX-Li1b (5 ug) obtido de forma recombinante em bactéria (Matsubara *et al.*, 2013) foram preparadas em tampão de amostra contendo 5% de β-mercaptoetanol, fervidas por 5

minutos a 100°C e aplicadas em gel desnaturante de poliacrilamida 18%. Após o término da corrida, os perfis proteicos foram transferidos para membrana de nitrocelulose por uma hora, à voltagem constante de 100 V. Em seguida, as membranas foram coradas com o corante Ponceau-S para verificar a eficiência da transferência. Tiras individuais de nitrocelulose foram recortadas e incubadas com solução de bloqueio, constituída de leite desnatado em pó (Molico, Nestlé) 3% (p/v) em PBS, por uma hora, à temperatura ambiente (T.A.). As tiras individuais foram incubadas separadamente, por duas horas, à temperatura ambiente e sob constante agitação, com 2 ml dos diferentes soros pré-ímmunes e hiperímmunes anti-veneno total (diluídos 1:1000 na mesma solução de bloqueio): anti-*L. intermedia*, anti-*L. laeta* e anti-*L. gaucho*. Em seguida, todas as membranas foram lavadas 5 vezes por 3 minutos com PBS-leite e incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina (diluuição de 1:8000) por uma hora (T.A.). Após 5 lavagens, as reações foram reveladas com o substrato BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato) e o cromógeno NBT (“nitro blue tetrazolium”) (Promega) em tampão ótimo para atividade de fosfatase alcalina (Tris-HCl 100mM pH 9,5; NaCl 100mM e MgCl<sub>2</sub> 5mM).

#### **Obtenção Das Glândulas Produtoras De Veneno de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* E Extração Do RNA Total**

Cem espécimes adultas de *L. intermedia* e trinta espécimes adultas de *L. laeta* e *L. gaucho* foram submetidas à extração de veneno por eletrochoque. Após cinco dias foi realizada a extração de RNA das glândulas de veneno. As vidrarias, agulhas e lâminas de barbear utilizadas para a extração das glândulas foram esterilizadas a 200°C por 8 h; os microtubos de 2 mL e as ponteiras foram autoclavadas por 40 min. Para evitar a contaminação com RNases, todo o procedimento foi realizado utilizando luvas e máscara em sala e bancada previamente limpas com solução de hipoclorito de sódio (3%) e álcool 70%. As aranhas foram anestesiadas em atmosfera de clorofórmio, e com auxílio da lâmina de bisturi e agulhas, os pares de glândulas foram coletados e congelados imediatamente em microtubos mantidos em gelo seco.

A extração do RNA foi baseada no método de TRIzol® (Chomczynski, 1993): 750 µL do reagente TRIzol® foram adicionados aos microtubos contendo

as glândulas congeladas. O material foi então homogeneizado com auxílio de um homogeneizador de tecidos (Tecnal, São Paulo, Brasil) e, após incubação por 5 min à temperatura ambiente, foram adicionados 150 µL de clorofórmio, seguido de vigorosa agitação por 15 s e centrifugação a 20.000xg por 20 min, a 4°C. Após a centrifugação três fases foram formadas: a fase aquosa contendo RNA, a fase proteica e a fase orgânica contendo DNA genômico. A fase aquosa foi retirada cuidadosamente e 375 µL de isopropanol foram adicionados aos tubos, os quais foram mantidos à T.A. por 10 min para precipitação do RNA. Após a centrifugação (20.000xg, 30 min, 4°C), o sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol 75% foi adicionado para lavar o *pellet* de RNA. Em seguida, procedeu-se nova centrifugação por 5 min. Após retirada do sobrenadante, os microtubos foram abertos em fluxo laminar e imersos em gelo até que o *pellet* estivesse seco, o qual foi ressuscitado em 10µL de água ultrapura tratada com DEPC (água ultrapura homogeneizada com 0,1% de DEPC por duas horas e autoclavada por 45 minutos).

### **Quantificação E Análise Da Integridade Do RNA Total Extraído**

A concentração do RNA extraído e a relação de ácido nucleico em relação à contaminação por proteínas foram determinadas por meio de dosagem em Nanovue® (GE LifeSciences), com a utilização de 1µL do RNA total extraído. Para saber a integridade do RNA extraído, foi realizada eletroforese em gel agarose 1% com brometo de etídio (0,5 µg/ml) em tampão TAE (Tris base 40 mM/ acetato 20 mM/ EDTA 1 mM) e corrida eletroforética em cuba horizontal a 5 V/cm de gel. O gel foi visualizado e a imagem foi registrada com auxílio de aparelho de análise de imagens Chemidoc – XRS e software Quantity One – SW (BioRad).

### **Desenho Dos *Primers* Para A Amplificação Dos Peptídeos ICK**

Os *primers* específicos foram desenhados manualmente e analisados por meio do algoritmo OligoAnalyzer versão 3.1 (disponível no endereço <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Para cada grupo de peptídeos ICK (LiTx1, 2, 3 e 4) foi sintetizado um *primer* específico baseado nas *ESTs*



("Expressed Sequence Tags") obtidas no estudo do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* por Gremski e colaboradores (2010). Para isso, as *ESTs* correspondentes a cada grupo de peptídeo ICK foram alinhadas por meio da ferramenta Clustal Omega (disponível no endereço <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e as regiões de maior conservação no peptídeo-sinal ou propeptídeo, em termos de resíduos de nucleotídeos, foram selecionadas para a construção dos *primers*. Os *primers* utilizados para a amplificação de cada grupo de peptídeo estão relacionados na Tabela 1.

<i>Primer</i>	Sequência do <i>Primer</i>	Temperatura de Anelamento
LiTx1	ATGAGGTTTCTCGTTGGAGCA	56,7° C
LiTx2	ATGAAGCTGCTGTTTGAAGGA	56° C
LiTx3	CTAGCCATATATGTGGCGAC	54,6° C
LiTx4	ATGAAGCTGTTGTTTGGAG	53,9° C

**Tabela 1: Sequências e temperatura de anelamento dos primers sintetizados para a amplificação dos peptídeos ICK de *L. laeta* e *L. gaucho*.**

### **Transcrição Reversa Acoplada À Reação Em Cadeia Da Polimerase (RT-PCR)**

O RNA total de glândulas de veneno de *L. laeta* e *L. gaucho* foi submetido a reações de RT-PCR para a obtenção de cDNAs correspondentes aos mRNAs dos peptídeos ICK presentes nas glândulas de veneno de *L. gaucho* e *L. laeta*. Os microtubos de PCR contendo *primer* oligo(dT)<sub>17</sub> adaptor (0,5 µg/µL), RNA total (1 µg de *L. laeta* ou *L. gaucho*) e água suficiente para 5 µL foram incubados no termociclador (My Cycler – Thermal Cycler, BioRad) a 72°C por 5 min para desnaturação da simples fita de RNA. Após, os microtubos foram retornados imediatamente ao gelo (3 a 5 min). Adicionou-se então tampão para a enzima transcriptase reversa (1x), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de dNTPs, 20 U de inibidor de RNase e água DEPC-tratada suficiente para 10µL. Os tubos foram colocados novamente no termociclador a 42°C para anelamento do *primer* oligo(dT)<sub>17</sub> adaptor e após 1 min, foi adicionado 200 U de enzima transcriptase reversa. As

amostras foram submetidas aos ciclos de 25°C/5min, 42°C/60min, 70°C/10min e 4°C/∞ (ciclo de espera). Os cDNAs produzidos foram seletivamente precipitados com acetato de amônio (2,5 M) e etanol absoluto gelado (0,1v:3v de amostra). A mistura foi incubada a -20°C por 30 min. Procedeu-se então centrifugação a 4°C, 20.000xg, por 30 min. Após a retirada do sobrenadante, o *pellet* foi lavado com 750 µL de etanol 70% gelado e centrifugado a 4°C, 20.000xg, por 5 min. Seguiu-se a retirada do sobrenadante e, por fim, o *pellet* foi ressuspenso em 12 µl de água ultrapura.

### **Amplificação De Sequências Correspondentes Aos Peptídeos ICK DE *L. gaucho* E *L. laeta***

Os cDNAs obtidos na reação de RT-PCR foram utilizados como molde em reações de PCR convencional de 30 µl. Como *primer forward* foram utilizados em cada reação conduzida separadamente um *primer* gene-específico para um grupo específico de peptídeo ICK (LiTx1, 2, 3 e 4) (0,4 µM). As reações continham ainda tampão da Taq DNA polimerase (1x), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM), *primer reverse* Oligo(dT)17-adaptor (0,4 µM), cDNA de *L. gaucho* ou *L. laeta* (3µ, equivalente a 10% do volume da reação) e Taq DNA polimerase (1,25U/50µL). As reações foram realizadas em termociclador pré-aquecido (“*hot- start*”) a 95°C seguido dos ciclos: 95°C/2 min (1 ciclo); 95°C/30 s, temperatura de anelamento média entre os *primers* específicos e Oligo(dT)17-adaptor/30 s, 72°C/2 min (35 ciclos); 72°C/10 min (1ciclo); 4°C/∞ (ciclo de espera).

<i>Peptídeo Rastreado</i>	Temperatura de Anelamento
LiTx1	55,8° C
LiTx2	55,5° C
LiTx3	54,8° C
LiTx4	54,5° C

**Tabela 2: Temperatura de anelamento dos primers utilizadas para a amplificação das sequências codificantes dos 4 grupos de peptídeos estudados.** A temperatura de anelamento indicada corresponde às médias das

temperaturas de anelamentos dos *primers forward* gene-específicos (mostrados na tabela 1) e do *primer reverse* Oligo(dT)17-adaptor.

A análise dos produtos de PCR amplificados foi realizada por meio de gel de agarose 1,5%. Em seguida, as bandas amplificadas foram recortadas e o DNA foi extraído com a utilização do kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA). As amostras eluídas foram dosadas em aparelho NanoVue Plus® (GE Healthcare Life Sciences).

### **Clonagem Dos Produtos Amplificados Em Vetor De pGEM-T Easy Vector**

Os produtos amplificados e purificados foram submetidos à ligação em vetor de clonagem pGEM-T (vetor A-T) (Promega) em uma proporção de 3:1 (inserto:vetor). As reações apresentaram volume final de 10 µl, a qual continha tampão para a enzima T4 DNA Ligase (2X), T4 DNA Ligase (3 U/µl), vetor pGEM-T Easy Vector (50 ng) e as quantidades de inserto previamente calculadas de acordo com a concentração do inserto, considerando a proporção 3:1 estabelecida. As reações foram incubadas em termociclador por 16 h, à 22°C.

### **Transformação Das Construções Em Bactérias Por Eletroporação**

Uma alíquota de solução de bactérias da cepa DH5α eletrocompetentes (30 µl) foi retirada do freezer -80°C e mantida em gelo. Quando descongelada, foi adicionado 1µl da reação de ligação, a mistura foi homogeneizada e colocada em uma cubeta de eletroporação. Procedeu-se então a eletroporação em aparelho Gene Pulser X-Cell (BioRad). As bactérias foram recuperadas em meio SOC (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM e glicose 0,2 M) e incubadas por uma hora sob moderada agitação (aproximadamente 100 rpm), a 37°C em agitador do tipo shaker. Após o período de recuperação as bactérias foram plaqueadas em duas placas diferentes contendo meio LB ágar (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de sódio 10 g/L, agar-ágar 15 g/L) suplementado com ampicilina (100 µg/ml) e previamente tratado com IPTG (100 mM) e X-GAL (20 mg/ml): uma das placas recebeu 100 µl da suspensão bacteriana e a outra recebeu o equivalente

aos 900 µl restantes. O plaqueamento foi realizado com alça de Gauss estéril e as placas foram incubadas a 37°C em incubadora do tipo B.O.D. modelo 411 D (Nova Ética), por 16 h.

### PCR De Colônia

Após observação das placas anteriormente citadas, foram escolhidas aleatoriamente colônias brancas (supostamente com inserto clonado) para a realização de PCR de colônia, a fim de identificar clones positivos. Foram testados 50 clones para cada grupo de peptídeos de cada uma das espécies em estudo (*L. gaucho* e *L. laeta*). As colônias escolhidas foram tocadas com auxílio de palito de madeira estéril; esse material coletado foi esfregado no fundo de um tubo de 0,2 mL e, em seguida, inoculado em uma “*master plate*” (placa quadriculada na qual os clones são numericamente identificados). Nos tubos foram acrescentados tampão para Taq DNA polimerase (1X), dNTPs (0,2 mM), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), *primer* T7 sense *forward* (0,2 µM), *primer* SP6 reverse (0,2 µM) e enzima Taq DNA polimerase (1,25U/50µl). As reações foram então incubadas em termociclador para amplificação do inserto de acordo com o seguinte protocolo: 95°C/5 min (1 ciclo); 95°C/30 s, média das T<sub>m</sub> (temperatura de “*melting*”) dos *primers* diminuída de 5°C/30 s e 72°C/2 min (35 ciclos); 72°C/10 min (1 ciclo); 4°C/infinity (ciclo de espera). Os produtos de amplificação do PCR de colônia foram analisados em gel de agarose 1,5%. O resultado foi visualizado e registrado em aparelho de captura de imagem Chemidoc (Bio-Rad) por meio do software Quantity One.

### Minipreparação Plasmidial

A partir da “*master plate*”, os clones positivos selecionados foram picados com auxílio de pinça e palitos de madeira estéreis para um pré-inóculo de 5 mL, em meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/mL), realizado em tubos cônicos de 50 mL. Esses pré-inóculos foram incubados por 16 h, a 37°C, sob agitação constante de 200 rpm em incubadora do tipo “*shaker*” 430 RDB (Nova Ética). Cada cultura saturada foi então centrifugada (3.000xg, por 3 min) à temperatura ambiente para a obtenção do *pellet* bacteriano. De cada um dos centrifugados

bacterianos foi feita a extração das construções com auxílio do kit de Miniprep Pure Link Quick Plamid Miniprep Kit (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante. As amostras foram submetidas à dosagem em aparelho NanoVue Plus® (GE Healthcare Life Sciences).

## **PCR De Sequenciamento, Precipitação E Análise De Sequenciamento**

Para as reações de sequenciamento foram utilizados o reagente BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Life Technologies), 400 ng de DNA molde (construções constituídas pelas sequências codificantes dos peptídeos ICK amplificadas e clonadas no vetor pGEM-T Easy Vector), tampão de sequenciamento (1X) e *primer forward* T7 ou o *primer reverse* SP6 (0,8 pmol); para cada clone sequenciado as reações de PCR de sequenciamento foram conduzidas em duplicata, sendo uma delas realizada com o primer T7 e a outra com o primer SP6. As reações foram realizadas em termociclador MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) de acordo com a seguinte programação: 95°C/20 min, 50°C/15 s e 60°C/4 min (35 ciclos); 4°C/infinity (ciclo de espera). Logo após, foram adicionados aos produtos do PCR de sequenciamento acetato de sódio-EDTA (1,5 M) e etanol absoluto gelado (proporção 0,1v:3v de amostra), seguido de precipitação em gelo por 10 minutos. A mistura foi então centrifugação a 4°C, 20.000xg, por 30 min. Após retirado o sobrenadante, o *pellet* foi lavado com 750 µl de etanol 70% gelado, centrifugado a 4°C, 20.000xg, por 5 min e seco em fluxo laminar. Após precipitação e secagem do material, os produtos foram ressuspensos em formamida para a leitura no sequenciador ABI PRISM 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

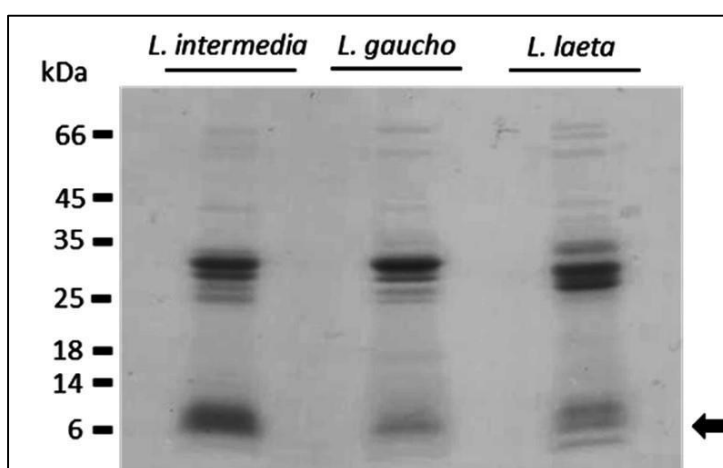
Os eletroferogramas gerados foram analisados com o auxílio do software FinchTV Version 1.4.0. As sequências nucleotídicas resultantes foram traduzidas e submetidas à verificação da fase de leitura correta por meio das ferramentas *online* Open Reading Frame Finder (disponível no endereço (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) e Expasy Translate (disponível no endereço <http://web.expasy.org/translate/>); ambas as análises foram realizadas utilizando as configurações padrão dos programas. Os alinhamentos das sequências foram produzidos no algoritmo *online* Clustal Omega (disponível no endereço <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) tendo como base as

sequências dos peptídeos LiTx de *L. intermedia* descritos por De Castro e colaboradores (2004) e depositadas no banco de dados *online* GenBank (Números de acesso – LiTx1: Q6B4T5; Litx2: Q6B4T4; LiTx3: Q6B4T3; LiTx4: Q27Q53), e as sequências obtidas por Gremski e colaboradores (2010) no estudo do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia*. Os alinhamentos gráficos foram realizados por meio da ferramenta *online* BOXSHADE Server versão 3.21 (disponível no endereço [http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)). As porcentagens de identidade das sequências de *L. gaucha* e *L. laeta* em relação às sequências de LiTx descritas por De Castro e colaboradores (2004) foram determinadas por meio da ferramenta *online* BLASTp (disponível no endereço [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)).

## 4 RESULTADOS

### Perfil Proteico Eletroforético Dos Venenos De *L. intermedia*, *L. gaucho* E *L. laeta* Em SDS-PAGE

Uma análise comparativa dos venenos brutos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* submetidos a SDS-PAGE revelou perfis protéicos eletroforéticos muito similares (Figura 7). Esse perfil é caracterizado por duas regiões bastante enriquecidas em proteínas ou peptídeos, as quais são, devido à mobilidade eletroforética apresentada, associadas às enzimas fosfolipases-D (faixa de 30 a 35 kDa) e aos peptídeos de baixa massa (faixa de 5 a 10 kDa) presentes nesses venenos (Figura 7). A presença de bandas de alta intensidade na região correspondente aos peptídeos é um evidente indício da presença de peptídeos ICK em todos os venenos testados.

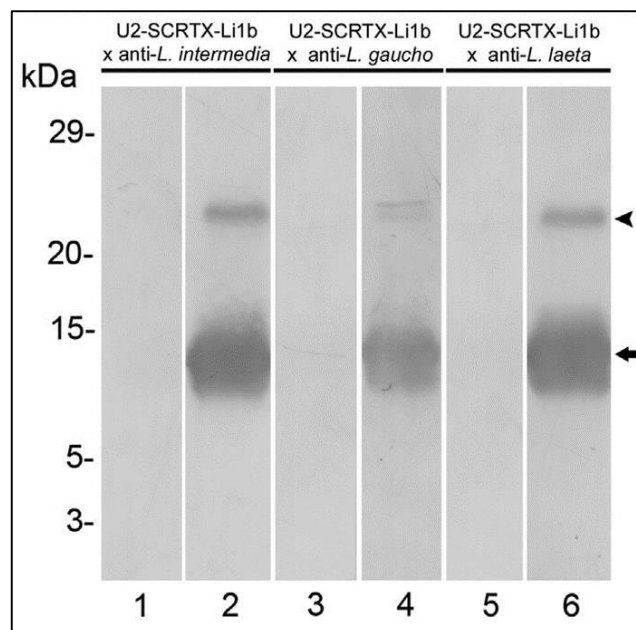


**FIGURA 7:** Separação eletroforética dos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* por meio de gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) gradiente 10-20%. Em destaque (seta), a região correspondente aos peptídeos presentes nos venenos.

### Reatividade Imunológica Cruzada De Um Peptídeo ICK Recombinante E Antivenenos De Diferentes Espécies De Aranhas Do Gênero *Loxosceles*

Outra evidência da provável presença de peptídeos ICK em todos os venenos em estudo foi verificada por meio de imunoensaio de *western blotting*.

O peptídeo recombinante U<sub>2</sub>-SCTX-Li1b, tanto na sua forma monomérica (~12 kDa) quanto na sua forma dimérica (~24 kDa), foi reconhecido pelos soros hiperimunes que reconhecem o veneno de cada uma das espécies estudadas, sugerindo a presença de toxinas nativas com epítomos lineares relacionados com peptídeos da família ICK nestes venenos (Figura 8).



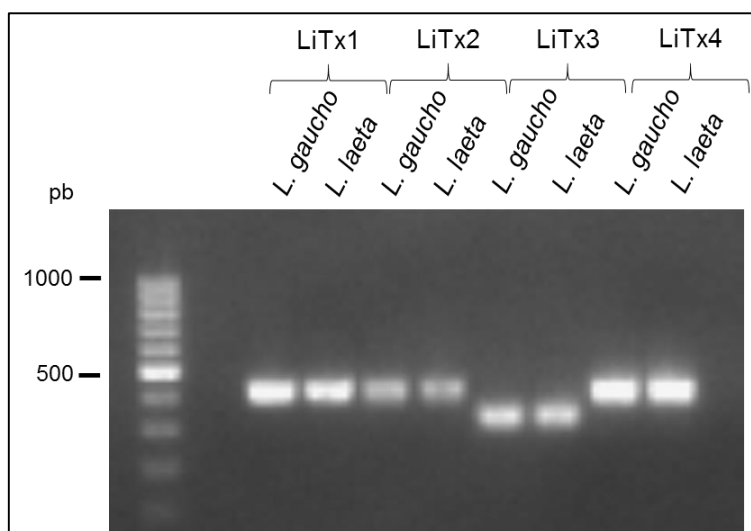
**FIGURA 8: Reatividade imunológica cruzada dos soros hiperimunes que reconhecem o veneno total de diferentes espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* com o peptídeo recombinante U<sub>2</sub>-SCTX-Li1b.** Amostras purificadas do peptídeo recombinante U<sub>2</sub>-SCTX-Li1b (5 µg) foram submetidas a SDS-PAGE 18% sob condições redutoras e transferidas para membranas de nitrocelulose. Essas amostras foram expostas aos soros pré-imunes (1, 3 e 5) e hiperimunes que reconhecem o veneno total de *L. intermedia* (2), de *L. gaucho* (4) e *L. laeta* (6). Reações positivas podem ser verificadas tanto para as formas monoméricas (~12 kDa; seta) quanto para as formas diméricas (~24 kDa; cabeça de seta) do peptídeo recombinante.

#### **Rastreamento De Sequências Codificantes De Peptídeos ICK Em *L. gaucho* E *L. laeta***

A partir do RNA total purificado das glândulas de veneno das aranhas *L. gaucho* e *L. laeta* foram realizadas reações de RT-PCR com o objetivo de obter os cDNAs relacionados às toxinas produzidas pelas células dessas glândulas. Após a obtenção dos cDNAs, reações de PCR foram conduzidas para a amplificação das sequências codificantes de peptídeos ICK; em cada uma



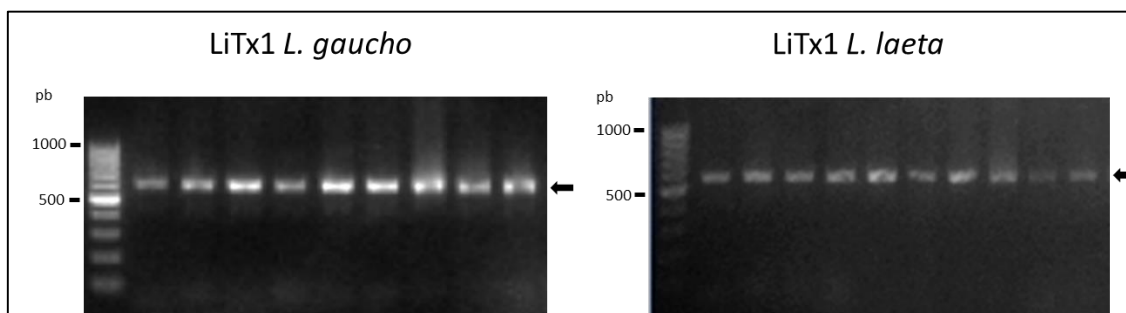
dessas reações foi utilizado um par de *primers*, representado pelo primer gene-específico do grupo de toxina a ser rastreado e o primer oligo(dT)17-adaptor. Todas as reações de amplificação foram bem-sucedidas, como pode ser observado na figura 9 abaixo. As sequências relacionadas aos grupos dos peptídeos semelhantes à LiTx1, LiTx2 e LiTx4 revelaram um tamanho de, aproximadamente, 400 pb tanto para *L. gaucho* quanto para *L. laeta*. As sequências associadas às toxinas do grupo das LiTx3, por sua vez, revelaram um tamanho aproximado de 300 pb (Fig. 9) em ambas as espécies em estudo.



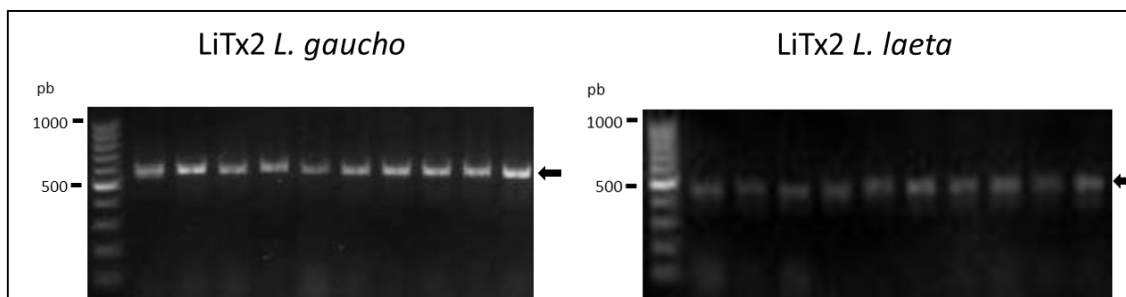
**FIGURA 9: Amplificação das sequências relativas aos diferentes grupos de LiTx (Litx1-4) analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,5%. A amplificação foi realizada por meio de PCR convencional com a utilização de um par de primers composto pelo primer forward gene-específico do grupo de LiTx a ser rastreado e o primer reverse oligo(dT)17-adaptor.**

As bandas referentes às sequências dos peptídeos visualizadas no gel de agarose foram extraídas do gel, ressuspensas em água ultrapura e dosadas. Em seguida, o material foi utilizado para a clonagem no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega) por meio de reação de ligação. Procedeu-se então a transformação dos produtos de ligação em bactérias da cepa DH5 $\alpha$ , seguida de confirmação por PCR de colônia dos clones positivos. Para cada um dos grupos de peptídeo (LiTx1-4), no material proveniente de ambas as espécies estudadas, 50 clones foram testados no PCR de colônia. Em todos os casos, aproximadamente 45 clones foram positivos, isto é, continham as sequências de interesse clonadas. Para os grupos de peptídeos semelhantes a LiTx1, LiTx2 e LiTx4 os fragmentos

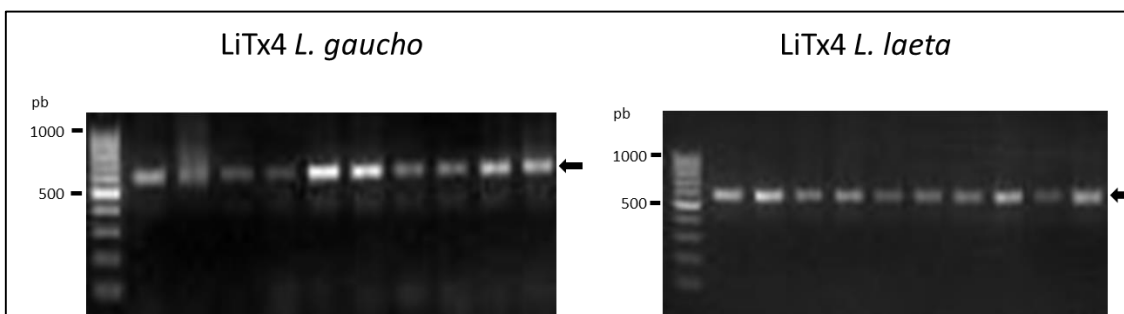
amplificados apresentaram tamanho aproximado de 600 pb, como esperado, sendo 400 pb referentes às sequências codificantes dos peptídeos e 200 pb referentes às porções do vetor amplificadas devido ao anelamento dos primers utilizados na reação (figuras 10, 11 e 12).



**Figura 10: Análise do perfil eletroforético dos produtos amplificados no PCR de colônia referente aos peptídeos semelhantes a LiTx1 em *L. gaucho* (à esquerda) e *L. laeta* (à direita) (gel de agarose 1,5%).** Gel representativo de 10 clones testados. Todos os clones foram positivos e demonstram banda na altura aproximada de 600 pb, sendo 400 pb relativos ao inserto e, aproximadamente, 200 pb referentes às porções do vetor amplificadas. Para a amplificação dos fragmentos no PCR de colônia foram utilizados o primer *forward* T7 sense e o primer reverse SP6.

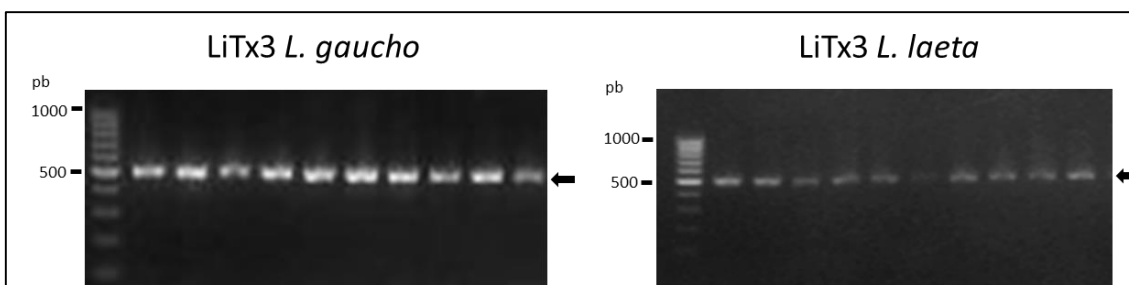


**Figura 11: Análise do perfil eletroforético dos produtos amplificados no PCR de colônia referente aos peptídeos semelhantes a LiTx2 em *L. gaucho* (à esquerda) e *L. laeta* (à direita) (gel de agarose 1,5%).** Gel representativo de 10 clones testados. Todos os clones foram positivos e demonstram banda na altura aproximada de 600 pb, sendo 400 pb relativos ao inserto e, aproximadamente, 200 pb referentes às porções do vetor amplificadas. Para a amplificação dos fragmentos no PCR de colônia foram utilizados o primer *forward* T7 sense e o primer reverse SP6.



**Figura 12: Análise do perfil eletroforético dos produtos amplificados no PCR de colônia referente aos peptídeos semelhantes a LiTx4 em *L. gaucho* (à esquerda) e *L. laeta* (à direita) (gel de agarose 1,5%).** Gel representativo de 10 clones testados. Todos os clones foram positivos e demonstram banda na altura aproximada de 600 pb, sendo 400 pb relativos ao inserto e, aproximadamente, 200 pb referentes às porções do vetor amplificadas. Para a amplificação dos fragmentos no PCR de colônia foram utilizados o primer forward T7 sense e o primer reverse SP6.

Para o grupo dos peptídeos semelhantes a LiTx3, os fragmentos amplificados apresentaram tamanho aproximado de 500 pb, como esperado, sendo 300 pb referentes às sequências codificantes dos peptídeos e 200 pb referentes às porções do vetor amplificadas devido ao anelamento dos primers utilizados na reação (figura 13).



**Figura 13: Análise do perfil eletroforético dos produtos amplificados no PCR de colônia referente aos peptídeos semelhantes a LiTx3 em *L. gaucho* (à esquerda) e *L. laeta* (à direita) (gel de agarose 1,5%).** Gel representativo de 10 clones testados. Todos os clones foram positivos e demonstram banda na altura aproximada de 600 pb, sendo 300 pb relativos ao inserto e, aproximadamente, 200 pb referentes às porções do vetor amplificadas. Para a amplificação dos fragmentos no PCR de colônia foram utilizados o primer forward T7 sense e o primer reverse SP6.

Para a análise das sequências codificantes dos peptídeos nas duas espécies em estudo, dez clones positivos confirmados pelo PCR de colônia foram selecionados. Procedeu-se a realização de *minipreps* para a purificação

das construções de cada um dos clones, seguida de PCR de sequenciamento e sequenciamento pelo método dos dideoxinucleotídeos em aparelho 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram então trimadas e submetidas a análises bioinformáticas como descrito no tópico de métodos acima.

Em todas as sequências preditas encontradas, os resíduos de cisteína mostraram-se conservados em relação aos peptídeos LiTx1, LiTx2, LiTx3 e LiTx4 de *L. intermedia*, como pode ser verificado nas figuras 14, 15, 16 e 17 (marcados com asteriscos). Adicionalmente, os prováveis resíduos de cisteína que estabelecem as pontes dissulfeto que compõem o motivo estrutural “nó de cistina inibidor”, o qual confere nome a essa família de peptídeos (ICK), também estão conservados.

Para a espécie *L. gaucha*, em relação aos peptídeos semelhantes a LiTx1, os clones sequenciados revelaram duas possíveis isoformas (figura 14): uma das sequências obtidas (Tx1\_gauchol) é a própria isoforma LiTx1 encontrada no veneno de *L. intermedia* por De Castro e colaboradores (2004) e por Gremski e colaboradores (2010). A outra sequência encontrada apresenta duas diferenças na sequência primária predita em relação a LiTx1, envolvendo a substituição de um resíduo lisina (K) por um resíduo de glutamina (Q) na posição 13 e a substituição de um resíduo de lisina (K) por um resíduo de arginina (R) na posição 46; tal sequência apresenta identidade de 96% em relação a LiTx1. Para a espécie *L. laeta*, 6 possíveis isoformas do peptídeo LiTx1 foram encontradas (Tx1\_laetal-VI), apresentando identidade que varia de 87% a 93% em relação à sequência do peptídeo LiTx1 (figura 14). Essas sequências encontradas para *L. laeta* apresentam aminoácidos conservados entre elas e que divergem dos resíduos encontrados na LiTx1: resíduos de alanina(A) (posição 1), de lisina (K) (posição 21), de ácido aspártico (D) (posição 31) e de glutamina (Q) (posição 39); nas mesmas posições, no peptídeo LiTx1, são encontrados resíduos de lisina (K) (posição 1), de arginina (N) (posição 21), de serina (S) (posição 31) e de metionina (M) (posição 39) (figura 14).

Em relação ao grupo dos peptídeos LiTx2, para *L. gaucha*, duas prováveis isoformas foram encontradas, ambas apresentando identidade de 85% com o peptídeo LiTx2 de *L. intermedia* (figura 15); em ambas as sequências relacionadas, as divergências em relação a LiTx2 estão associadas aos resíduos

de aminoácidos 11 a 14 (ADQP e AVQP) e aos resíduos nas posições 31 a 33 (STS). Para *L. laeta* também foram encontradas duas prováveis isoformas, as quais apresentam 87% de identidade com LiTx2 (figura 15); assim como para *L. gaucho*, as diferenças nas sequências aminoacídicas preditas estão restritas às posições 11 a 14 (AAEP e ADEP) e às posições 31 a 33 (QTA e QTS).

As isoformas relacionadas com o peptídeo LiTx3 em *L. intermedia* são muito diversas, como demonstrado pelo estudo do transcriptoma da glândula de veneno (Gremski *et al.*, 2010) (figura 16). Para *L. gaucho* e *L. laeta*, por outro lado, as sequências rastreadas foram agrupadas em duas isoformas apenas para cada gênero, como mostrado na figura 16. Para *L. gaucho*, uma das sequências encontradas corresponde à própria LiTx3 de *L. intermedia*, o que se verifica pela identidade de 100% entre elas; a outra isoforma encontrada em *L. gaucho* apresenta 87% de identidade com LiTx3. As duas isoformas de LiTx3 encontradas em *L. laeta* apresentam identidade de 90% e 92% com o peptídeo de *L. intermedia*. Uma importante diferença encontrada para as sequências em *L. laeta* em relação às sequências de LiTx3 das outras duas espécies é o número de resíduos de aminoácidos na sequência predita: 52 resíduos em *L. laeta* e 53 resíduos tanto em *L. gaucho* e *L. intermedia* (figura 16).

Por fim, para o grupo das LiTx4, tanto para *L. gaucho* quanto para *L. laeta*, os clones rastreados revelaram sequências que foram agrupadas em duas prováveis isoformas (figura 17). Em *L. gaucho*, uma das isoformas é a própria LiTx4 encontrada em *L. intermedia* (100% de identidade), e a outra apresenta 83% de identidade com LiTx4. Para *L. laeta*, as duas isoformas encontradas apresentam identidade de 83% e 85% com a sequência do peptídeo LiTx4 (figura 17).

IDENTIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA	ESPÉCIE	SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA	IDENTIDADE (%)	REFERÊNCIA
LiTx1	<i>L. intermedia</i>	KCHGDGSKGCATKPDDWCKNTPKCPAWSSTSECRCAQDCSRRCR	-	De Castro et al., 2004
LIC425	<i>L. intermedia</i>	KCHGDGSKGCATKPDDWCKNTPKCPAWSSTSECRCAQDCSRRCR	100	Gremski et al., 2010
LIC385	<i>L. intermedia</i>	KCHGDGSKGCATKPDDWCKNTPKCPAWSSTSECRCAQDCSRRCR	98	Gremski et al., 2010
Tx1_gauchaI	<i>L. gaucha</i>	KCHGDGSKGCATKPDDWCKNTPKCPAWSSTSECRCAQDCSRRCR	100	Este trabalho
Tx1_gauchaII	<i>L. gaucha</i>	KCHGDGSKGCATKPDDWCKNTPKCPAWSSTSECRCAQDCSRRCR	96	Este trabalho
Tx1_laetaI	<i>L. laeta</i>	ACHGDGSKGCATKPDDWCKNTPKCPAWSSTSECRCAQDCSRRCR	89	Este trabalho
Tx1_laetaII	<i>L. laeta</i>	ACHGDGSKGCATKPDDWCKNTPKCPAWSSTSECRCAQDCSRRCR	87	Este trabalho
Tx1_laetaIII	<i>L. laeta</i>	ACHGDGSKGCATKPDDWCKNTPKCPAWSSTSECRCAQDCSRRCR	93	Este trabalho
Tx1_laetaIV	<i>L. laeta</i>	ACHGDGSKGCATKPDDWCKNTPKCPAWSSTSECRCAQDCSRRCR	91	Este trabalho
Tx1_laetaV	<i>L. laeta</i>	ACHGDGSKGCATKPDDWCKNTPKCPAWSSTSECRCAQDCSRRCR	93	Este trabalho
Tx1_laetaVI	<i>L. laeta</i>	ACHGDGSKGCATKPDDWCKNTPKCPAWSSTSECRCAQDCSRRCR	91	Este trabalho

**Figura 14: Sequências codificantes de peptídeos do grupo LiTx1 encontradas para *L. gaucha* e *L. laeta* e comparação com isoformas preditas para *L. intermedia*.** Duas prováveis isoformas de LiTx1 foram encontradas para *L. gaucha* (Tx1\_gauchaI-II) e cinco prováveis isoformas foram encontradas para *L. laeta* (Tx1\_laetaI-VI). A sequência do peptídeo LiTx1 de *L. intermedia* já descrita na literatura também compõe o alinhamento aminoacídico. Os resíduos de cisteína conservados são indicados por asteriscos e os resíduos que estabelecem as pontes dissulfeto que compõem o “nó inibidor de cistina” são indicados por colchetes.

IDENTIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA	ESPÉCIE	SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA	IDENTIDADE (%)	REFERÊNCIA
LiTx2	<i>L. intermedia</i>	ACKGEGVKGCOYYEADDWCCKKTPCKCPAWSHERECRCTQPCNPSCR	-	De Castro et al., 2004
LIC436	<i>L. intermedia</i>	ACKGEGVKGCOYYEADDWCCKKTPCKCPAWSHERECRCTQPCNPSCR	100	Gremski et al., 2010
Tx2_gauchoI	<i>L. gaucho</i>	ACKGEGVKGCAEQPDDWCCKKTPCKCPAWSSITSECRCTQPCNPSCR	85	Este trabalho
Tx2_gauchoII	<i>L. gaucho</i>	ACKGEGVKGCAVQPDWCCCKKTPCKCPAWSSITSECRCTQPCNPSCR	85	Este trabalho
Tx2_laetaI	<i>L. laeta</i>	ACKGEGVKGCAAEPPDDWCCKKTPCKCPAWSOTAECRCTQPCNPSCR	87	Este trabalho
Tx2_laetaII	<i>L. laeta</i>	ACKGEGVKGCADEPDDWCCKKTPCKCPAWSOTSECRCTQPCNPSCR	87	Este trabalho

O diagrama ilustra o alinhamento das sequências de aminoácidos. Os resíduos de cisteína conservados são marcados com asteriscos (\*) e os resíduos que estabelecem as pontes dissulfeto são indicados por colchetes. As pontes dissulfeto são mostradas entre as posições 10 e 11, 12 e 13, 14 e 15, 16 e 17, 18 e 19, 20 e 21, 22 e 23, 24 e 25, 26 e 27, 28 e 29, 30 e 31, 32 e 33, 34 e 35, 36 e 37, 38 e 39, 40 e 41, 42 e 43, 44 e 45, 46 e 47, 48 e 49, 50 e 51, 52 e 53, 54 e 55, 56 e 57, 58 e 59, 60 e 61, 62 e 63, 64 e 65, 66 e 67, 68 e 69, 70 e 71, 72 e 73, 74 e 75, 76 e 77, 78 e 79, 80 e 81, 82 e 83, 84 e 85, 86 e 87, 88 e 89, 90 e 91, 92 e 93, 94 e 95, 96 e 97, 98 e 99, 100 e 101, 102 e 103, 104 e 105, 106 e 107, 108 e 109, 110 e 111, 112 e 113, 114 e 115, 116 e 117, 118 e 119, 120 e 121, 122 e 123, 124 e 125, 126 e 127, 128 e 129, 130 e 131, 132 e 133, 134 e 135, 136 e 137, 138 e 139, 140 e 141, 142 e 143, 144 e 145, 146 e 147, 148 e 149, 150 e 151, 152 e 153, 154 e 155, 156 e 157, 158 e 159, 160 e 161, 162 e 163, 164 e 165, 166 e 167, 168 e 169, 170 e 171, 172 e 173, 174 e 175, 176 e 177, 178 e 179, 180 e 181, 182 e 183, 184 e 185, 186 e 187, 188 e 189, 190 e 191, 192 e 193, 194 e 195, 196 e 197, 198 e 199, 200 e 201, 202 e 203, 204 e 205, 206 e 207, 208 e 209, 210 e 211, 212 e 213, 214 e 215, 216 e 217, 218 e 219, 220 e 221, 222 e 223, 224 e 225, 226 e 227, 228 e 229, 230 e 231, 232 e 233, 234 e 235, 236 e 237, 238 e 239, 240 e 241, 242 e 243, 244 e 245, 246 e 247, 248 e 249, 250 e 251, 252 e 253, 254 e 255, 256 e 257, 258 e 259, 260 e 261, 262 e 263, 264 e 265, 266 e 267, 268 e 269, 270 e 271, 272 e 273, 274 e 275, 276 e 277, 278 e 279, 280 e 281, 282 e 283, 284 e 285, 286 e 287, 288 e 289, 290 e 291, 292 e 293, 294 e 295, 296 e 297, 298 e 299, 300 e 301, 302 e 303, 304 e 305, 306 e 307, 308 e 309, 310 e 311, 312 e 313, 314 e 315, 316 e 317, 318 e 319, 320 e 321, 322 e 323, 324 e 325, 326 e 327, 328 e 329, 330 e 331, 332 e 333, 334 e 335, 336 e 337, 338 e 339, 340 e 341, 342 e 343, 344 e 345, 346 e 347, 348 e 349, 350 e 351, 352 e 353, 354 e 355, 356 e 357, 358 e 359, 360 e 361, 362 e 363, 364 e 365, 366 e 367, 368 e 369, 370 e 371, 372 e 373, 374 e 375, 376 e 377, 378 e 379, 380 e 381, 382 e 383, 384 e 385, 386 e 387, 388 e 389, 390 e 391, 392 e 393, 394 e 395, 396 e 397, 398 e 399, 400 e 401, 402 e 403, 404 e 405, 406 e 407, 408 e 409, 410 e 411, 412 e 413, 414 e 415, 416 e 417, 418 e 419, 420 e 421, 422 e 423, 424 e 425, 426 e 427, 428 e 429, 430 e 431, 432 e 433, 434 e 435, 436 e 437, 438 e 439, 440 e 441, 442 e 443, 444 e 445, 446 e 447, 448 e 449, 450 e 451, 452 e 453, 454 e 455, 456 e 457, 458 e 459, 460 e 461, 462 e 463, 464 e 465, 466 e 467, 468 e 469, 470 e 471, 472 e 473, 474 e 475, 476 e 477, 478 e 479, 480 e 481, 482 e 483, 484 e 485, 486 e 487, 488 e 489, 490 e 491, 492 e 493, 494 e 495, 496 e 497, 498 e 499, 500 e 501, 502 e 503, 504 e 505, 506 e 507, 508 e 509, 510 e 511, 512 e 513, 514 e 515, 516 e 517, 518 e 519, 520 e 521, 522 e 523, 524 e 525, 526 e 527, 528 e 529, 530 e 531, 532 e 533, 534 e 535, 536 e 537, 538 e 539, 540 e 541, 542 e 543, 544 e 545, 546 e 547, 548 e 549, 550 e 551, 552 e 553, 554 e 555, 556 e 557, 558 e 559, 560 e 561, 562 e 563, 564 e 565, 566 e 567, 568 e 569, 570 e 571, 572 e 573, 574 e 575, 576 e 577, 578 e 579, 580 e 581, 582 e 583, 584 e 585, 586 e 587, 588 e 589, 590 e 591, 592 e 593, 594 e 595, 596 e 597, 598 e 599, 600 e 601, 602 e 603, 604 e 605, 606 e 607, 608 e 609, 610 e 611, 612 e 613, 614 e 615, 616 e 617, 618 e 619, 620 e 621, 622 e 623, 624 e 625, 626 e 627, 628 e 629, 630 e 631, 632 e 633, 634 e 635, 636 e 637, 638 e 639, 640 e 641, 642 e 643, 644 e 645, 646 e 647, 648 e 649, 650 e 651, 652 e 653, 654 e 655, 656 e 657, 658 e 659, 660 e 661, 662 e 663, 664 e 665, 666 e 667, 668 e 669, 670 e 671, 672 e 673, 674 e 675, 676 e 677, 678 e 679, 680 e 681, 682 e 683, 684 e 685, 686 e 687, 688 e 689, 690 e 691, 692 e 693, 694 e 695, 696 e 697, 698 e 699, 700 e 701, 702 e 703, 704 e 705, 706 e 707, 708 e 709, 710 e 711, 712 e 713, 714 e 715, 716 e 717, 718 e 719, 720 e 721, 722 e 723, 724 e 725, 726 e 727, 728 e 729, 730 e 731, 732 e 733, 734 e 735, 736 e 737, 738 e 739, 740 e 741, 742 e 743, 744 e 745, 746 e 747, 748 e 749, 750 e 751, 752 e 753, 754 e 755, 756 e 757, 758 e 759, 760 e 761, 762 e 763, 764 e 765, 766 e 767, 768 e 769, 770 e 771, 772 e 773, 774 e 775, 776 e 777, 778 e 779, 780 e 781, 782 e 783, 784 e 785, 786 e 787, 788 e 789, 790 e 791, 792 e 793, 794 e 795, 796 e 797, 798 e 799, 800 e 801, 802 e 803, 804 e 805, 806 e 807, 808 e 809, 810 e 811, 812 e 813, 814 e 815, 816 e 817, 818 e 819, 820 e 821, 822 e 823, 824 e 825, 826 e 827, 828 e 829, 830 e 831, 832 e 833, 834 e 835, 836 e 837, 838 e 839, 840 e 841, 842 e 843, 844 e 845, 846 e 847, 848 e 849, 850 e 851, 852 e 853, 854 e 855, 856 e 857, 858 e 859, 860 e 861, 862 e 863, 864 e 865, 866 e 867, 868 e 869, 870 e 871, 872 e 873, 874 e 875, 876 e 877, 878 e 879, 880 e 881, 882 e 883, 884 e 885, 886 e 887, 888 e 889, 890 e 891, 892 e 893, 894 e 895, 896 e 897, 898 e 899, 900 e 901, 902 e 903, 904 e 905, 906 e 907, 908 e 909, 910 e 911, 912 e 913, 914 e 915, 916 e 917, 918 e 919, 920 e 921, 922 e 923, 924 e 925, 926 e 927, 928 e 929, 930 e 931, 932 e 933, 934 e 935, 936 e 937, 938 e 939, 940 e 941, 942 e 943, 944 e 945, 946 e 947, 948 e 949, 950 e 951, 952 e 953, 954 e 955, 956 e 957, 958 e 959, 960 e 961, 962 e 963, 964 e 965, 966 e 967, 968 e 969, 970 e 971, 972 e 973, 974 e 975, 976 e 977, 978 e 979, 980 e 981, 982 e 983, 984 e 985, 986 e 987, 988 e 989, 990 e 991, 992 e 993, 994 e 995, 996 e 997, 998 e 999, 1000 e 1001, 1002 e 1003, 1004 e 1005, 1006 e 1007, 1008 e 1009, 1010 e 1011, 1012 e 1013, 1014 e 1015, 1016 e 1017, 1018 e 1019, 1020 e 1021, 1022 e 1023, 1024 e 1025, 1026 e 1027, 1028 e 1029, 1030 e 1031, 1032 e 1033, 1034 e 1035, 1036 e 1037, 1038 e 1039, 1040 e 1041, 1042 e 1043, 1044 e 1045, 1046 e 1047, 1048 e 1049, 1050 e 1051, 1052 e 1053, 1054 e 1055, 1056 e 1057, 1058 e 1059, 1060 e 1061, 1062 e 1063, 1064 e 1065, 1066 e 1067, 1068 e 1069, 1070 e 1071, 1072 e 1073, 1074 e 1075, 1076 e 1077, 1078 e 1079, 1080 e 1081, 1082 e 1083, 1084 e 1085, 1086 e 1087, 1088 e 1089, 1090 e 1091, 1092 e 1093, 1094 e 1095, 1096 e 1097, 1098 e 1099, 1100 e 1101, 1102 e 1103, 1104 e 1105, 1106 e 1107, 1108 e 1109, 1110 e 1111, 1112 e 1113, 1114 e 1115, 1116 e 1117, 1118 e 1119, 1120 e 1121, 1122 e 1123, 1124 e 1125, 1126 e 1127, 1128 e 1129, 1130 e 1131, 1132 e 1133, 1134 e 1135, 1136 e 1137, 1138 e 1139, 1140 e 1141, 1142 e 1143, 1144 e 1145, 1146 e 1147, 1148 e 1149, 1150 e 1151, 1152 e 1153, 1154 e 1155, 1156 e 1157, 1158 e 1159, 1160 e 1161, 1162 e 1163, 1164 e 1165, 1166 e 1167, 1168 e 1169, 1170 e 1171, 1172 e 1173, 1174 e 1175, 1176 e 1177, 1178 e 1179, 1180 e 1181, 1182 e 1183, 1184 e 1185, 1186 e 1187, 1188 e 1189, 1190 e 1191, 1192 e 1193, 1194 e 1195, 1196 e 1197, 1198 e 1199, 1200 e 1201, 1202 e 1203, 1204 e 1205, 1206 e 1207, 1208 e 1209, 1210 e 1211, 1212 e 1213, 1214 e 1215, 1216 e 1217, 1218 e 1219, 1220 e 1221, 1222 e 1223, 1224 e 1225, 1226 e 1227, 1228 e 1229, 1230 e 1231, 1232 e 1233, 1234 e 1235, 1236 e 1237, 1238 e 1239, 1240 e 1241, 1242 e 1243, 1244 e 1245, 1246 e 1247, 1248 e 1249, 1250 e 1251, 1252 e 1253, 1254 e 1255, 1256 e 1257, 1258 e 1259, 1260 e 1261, 1262 e 1263, 1264 e 1265, 1266 e 1267, 1268 e 1269, 1270 e 1271, 1272 e 1273, 1274 e 1275, 1276 e 1277, 1278 e 1279, 1280 e 1281, 1282 e 1283, 1284 e 1285, 1286 e 1287, 1288 e 1289, 1290 e 1291, 1292 e 1293, 1294 e 1295, 1296 e 1297, 1298 e 1299, 1300 e 1301, 1302 e 1303, 1304 e 1305, 1306 e 1307, 1308 e 1309, 1310 e 1311, 1312 e 1313, 1314 e 1315, 1316 e 1317, 1318 e 1319, 1320 e 1321, 1322 e 1323, 1324 e 1325, 1326 e 1327, 1328 e 1329, 1330 e 1331, 1332 e 1333, 1334 e 1335, 1336 e 1337, 1338 e 1339, 1340 e 1341, 1342 e 1343, 1344 e 1345, 1346 e 1347, 1348 e 1349, 1350 e 1351, 1352 e 1353, 1354 e 1355, 1356 e 1357, 1358 e 1359, 1360 e 1361, 1362 e 1363, 1364 e 1365, 1366 e 1367, 1368 e 1369, 1370 e 1371, 1372 e 1373, 1374 e 1375, 1376 e 1377, 1378 e 1379, 1380 e 1381, 1382 e 1383, 1384 e 1385, 1386 e 1387, 1388 e 1389, 1390 e 1391, 1392 e 1393, 1394 e 1395, 1396 e 1397, 1398 e 1399, 1400 e 1401, 1402 e 1403, 1404 e 1405, 1406 e 1407, 1408 e 1409, 1410 e 1411, 1412 e 1413, 1414 e 1415, 1416 e 1417, 1418 e 1419, 1420 e 1421, 1422 e 1423, 1424 e 1425, 1426 e 1427, 1428 e 1429, 1430 e 1431, 1432 e 1433, 1434 e 1435, 1436 e 1437, 1438 e 1439, 1440 e 1441, 1442 e 1443, 1444 e 1445, 1446 e 1447, 1448 e 1449, 1450 e 1451, 1452 e 1453, 1454 e 1455, 1456 e 1457, 1458 e 1459, 1460 e 1461, 1462 e 1463, 1464 e 1465, 1466 e 1467, 1468 e 1469, 1470 e 1471, 1472 e 1473, 1474 e 1475, 1476 e 1477, 1478 e 1479, 1480 e 1481, 1482 e 1483, 1484 e 1485, 1486 e 1487, 1488 e 1489, 1490 e 1491, 1492 e 1493, 1494 e 1495, 1496 e 1497, 1498 e 1499, 1500 e 1501, 1502 e 1503, 1504 e 1505, 1506 e 1507, 1508 e 1509, 1510 e 1511, 1512 e 1513, 1514 e 1515, 1516 e 1517, 1518 e 1519, 1520 e 1521, 1522 e 1523, 1524 e 1525, 1526 e 1527, 1528 e 1529, 1530 e 1531, 1532 e 1533, 1534 e 1535, 1536 e 1537, 1538 e 1539, 1540 e 1541, 1542 e 1543, 1544 e 1545, 1546 e 1547, 1548 e 1549, 1550 e 1551, 1552 e 1553, 1554 e 1555, 1556 e 1557, 1558 e 1559, 1560 e 1561, 1562 e 1563, 1564 e 1565, 1566 e 1567, 1568 e 1569, 1570 e 1571, 1572 e 1573, 1574 e 1575, 1576 e 1577, 1578 e 1579, 1580 e 1581, 1582 e 1583, 1584 e 1585, 1586 e 1587, 1588 e 1589, 1590 e 1591, 1592 e 1593, 1594 e 1595, 1596 e 1597, 1598 e 1599, 1600 e 1601, 1602 e 1603, 1604 e 1605, 1606 e 1607, 1608 e 1609, 1610 e 1611, 1612 e 1613, 1614 e 1615, 1616 e 1617, 1618 e 1619, 1620 e 1621, 1622 e 1623, 1624 e 1625, 1626 e 1627, 1628 e 1629, 1630 e 1631, 1632 e 1633, 1634 e 1635, 1636 e 1637, 1638 e 1639, 1640 e 1641, 1642 e 1643, 1644 e 1645, 1646 e 1647, 1648 e 1649, 1650 e 1651, 1652 e 1653, 1654 e 1655, 1656 e 1657, 1658 e 1659, 1660 e 1661, 1662 e 1663, 1664 e 1665, 1666 e 1667, 1668 e 1669, 1670 e 1671, 1672 e 1673, 1674 e 1675, 1676 e 1677, 1678 e 1679, 1680 e 1681, 1682 e 1683, 1684 e 1685, 1686 e 1687, 1688 e 1689, 1690 e 1691, 1692 e 1693, 1694 e 1695, 1696 e 1697, 1698 e 1699, 1700 e 1701, 1702 e 1703, 1704 e 1705, 1706 e 1707, 1708 e 1709, 1710 e 1711, 1712 e 1713, 1714 e 1715, 1716 e 1717, 1718 e 1719, 1720 e 1721, 1722 e 1723, 1724 e 1725, 1726 e 1727, 1728 e 1729, 1730 e 1731, 1732 e 1733, 1734 e 1735, 1736 e 1737, 1738 e 1739, 1740 e 1741, 1742 e 1743, 1744 e 1745, 1746 e 1747, 1748 e 1749, 1750 e 1751, 1752 e 1753, 1754 e 1755, 1756 e 1757, 1758 e 1759, 1760 e 1761, 1762 e 1763, 1764 e 1765, 1766 e 1767, 1768 e 1769, 1770 e 1771, 1772 e 1773, 1774 e 1775, 1776 e 1777, 1778 e 1779, 1780 e 1781, 1782 e 1783, 1784 e 1785, 1786 e 1787, 1788 e 1789, 1790 e 1791, 1792 e 1793, 1794 e 1795, 1796 e 1797, 1798 e 1799, 1800 e 1801, 1802 e 1803, 1804 e 1805, 1806 e 1807, 1808 e 1809, 1810 e 1811, 1812 e 1813, 1814 e 1815, 1816 e 1817, 1818 e 1819, 1820 e 1821, 1822 e 1823, 1824 e 1825, 1826 e 1827, 1828 e 1829, 1830 e 1831, 1832 e 1833, 1834 e 1835, 1836 e 1837, 1838 e 1839, 1840 e 1841, 1842 e 1843, 1844 e 1845, 1846 e 1847, 1848 e 1849, 1850 e 1851, 1852 e 1853, 1854 e 1855, 1856 e 1857, 1858 e 1859, 1860 e 1861, 1862 e 1863, 1864 e 1865, 1866 e 1867, 1868 e 1869, 1870 e 1871, 1872 e 1873, 1874 e 1875, 1876 e 1877, 1878 e 1879, 1880 e 1881, 1882 e 1883, 1884 e 1885, 1886 e 1887, 1888 e 1889, 1890 e 1891, 1892 e 1893, 1894 e 1895, 1896 e 1897, 1898 e 1899, 1900 e 1901, 1902 e 1903, 1904 e 1905, 1906 e 1907, 1908 e 1909, 1910 e 1911, 1912 e 1913, 1914 e 1915, 1916 e 1917, 1918 e 1919, 1920 e 1921, 1922 e 1923, 1924 e 1925, 1926 e 1927, 1928 e 1929, 1930 e 1931, 1932 e 1933, 1934 e 1935, 1936 e 1937, 1938 e 1939, 1940 e 1941, 1942 e 1943, 1944 e 1945, 1946 e 1947, 1948 e 1949, 1950 e 1951, 1952 e 1953, 1954 e 1955, 1956 e 1957, 1958 e 1959, 1960 e 1961, 1962 e 1963, 1964 e 1965, 1966 e 1967, 1968 e 1969, 1970 e 1971, 1972 e 1973, 1974 e 1975, 1976 e 1977, 1978 e 1979, 1980 e 1981, 1982 e 1983, 1984 e 1985, 1986 e 1987, 1988 e 1989, 1990 e 1991, 1992 e 1993, 1994 e 1995, 1996 e 1997, 1998 e 1999, 2000 e 2001, 2002 e 2003, 2004 e 2005, 2006 e 2007, 2008 e 2009, 2010 e 2011, 2012 e 2013, 2014 e 2015, 2016 e 2017, 2018 e 2019, 2020 e 2021, 2022 e 2023, 2024 e 2025, 2026 e 2027, 2028 e 2029, 2030 e 2031, 2032 e 2033, 2034 e 2035, 2036 e 2037, 2038 e 2039, 2040 e 2041, 2042 e 2043, 2044 e 2045, 2046 e 2047, 2048 e 2049, 2050 e 2051, 2052 e 2053, 2054 e 2055, 2056 e 2057, 2058 e 2059, 2060 e 2061, 2062 e 2063, 2064 e 2065, 2066 e 2067, 2068 e 2069, 2070 e 2071, 2072 e 2073, 2074 e 2075, 2076 e 2077, 2078 e 2079, 2080 e 2081, 2082 e 2083, 2084 e 2085, 2086 e 2087, 2088 e 2089, 2090 e 2091, 2092 e 2093, 2094 e 2095, 2096 e 2097, 2098 e 2099, 2100 e 2101, 2102 e 2103, 2104 e 2105, 2106 e 2107, 2108 e 2109, 2110 e 2111, 2112 e 2113, 2114 e 2115, 2116 e 2117, 2118 e 2119, 2120 e 2121, 2122 e 2123, 2124 e 2125, 2126 e 2127, 2128 e 2129, 2130 e 2131, 2132 e 2133, 2134 e 2135, 2136 e 2137, 2138 e 2139, 2140 e 2141, 2142 e 2143, 2144 e 2145, 2146 e 2147

IDENTIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA	ESPÉCIE	SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA	IDENTIDADE (%)	REFERÊNCIA
LiTx3	<i>L. intermedia</i>	-GCIKYGDRCGSPHGLPSNCCNDWKYKGRCGCTMGVCTCGPNCPSRGCDWSKKG	-	De Castro et al., 2004
LIC431	<i>L. intermedia</i>	GDGIKSMKRCGSPHGLPSNCCGDWKYKGRCGCTMGVCTCGSDCPSSGCDWSKP-	86	Gremski et al., 2010
LIC341	<i>L. intermedia</i>	-GCIKYGDRCGSPHGLPSNCCNDWKYKGRCGCTMGVCTCGPNCPSRGCDWSKKG	100	Gremski et al., 2010
LIC433	<i>L. intermedia</i>	-GCIKYGDRCGSPHGLPSNCCNDWKYKGRCGCTMGVCTCGPNCPSRGCDWSKKG	100	Gremski et al., 2010
LIC390	<i>L. intermedia</i>	-GCIKSGQRCGSPHGLPSNCCDDWKYKGRCGCTMGVCTCGKNCPSRGCDWSKP-	92	Gremski et al., 2010
U2-SCTX-Li1b	<i>L. intermedia</i>	-GCIKSGQRCGSPHGLPSNCCDDWKYKGRCGCTMGVCTCGKNCPSRGCDYRTKG	87	Matsubara et al., 2013
Tx3_gauchaI	<i>L. gaucha</i>	-GCIKYGDRCGSPHGLPSNCCNDWKYKGRCGCTMGVCTCGPNCPSRGCDWSKKG	100	Este trabalho
Tx3_gauchaII	<i>L. gaucha</i>	-GCIKSGQRCGSPHGLPSNCCDDWKYKGRCGCTMGVCTCGKNCPSRGCDYRTKG	87	Este trabalho
Tx3_laetaI	<i>L. laeta</i>	-GCIKSGQRCGSPHGLPSNCCDDWKYKGRCGCTMGVCTCGKDCPSRGCDWSKP-	90	Este trabalho
Tx3_laetaII	<i>L. laeta</i>	-GCIKSGQRCGSPHGLPSNCCDDWKYKGRCGCTMGVCTCGKNCPSRGCDWSKP-	92	Este trabalho

**Figura 16: Sequências codificantes de peptídeos do grupo LiTx3 encontradas para *L. gaucha* e *L. laeta* e comparação com isoformas preditas para *L. intermedia*.** Duas prováveis isoformas de LiTx3 foram encontradas para *L. gaucha* (Tx3\_gauchaI-II) e outras duas prováveis isoformas foram encontradas para *L. laeta* (Tx3\_laetaI-II). Quatro prováveis isoformas de peptídeos LiTx3 já descritas na literatura também compõem o alinhamento aminoacídico. Os resíduos de cisteína conservados são indicados por asteriscos e os resíduos que estabelecem as pontes dissulfeto que compõem o “nó inibidor de cistina” são indicados por colchetes.



IDENTIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA	ESPÉCIE	SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA	IDENTIDADE (%)	REFERÊNCIA
LiTx4	<i>L. intermedia</i>	ACKGEGVKG CYDKPDDWCKKTPCKCPAWSHERECRCTQPCARRCR	-	De Castro et al., 2004
LIC427	<i>L. intermedia</i>	ACKGEGVKG CYDKPDDWCKKTPCKCPAWSHERECRCTQPCARRCR	100	Gremski et al., 2010
Tx4_gauchaI	<i>L. gaucha</i>	ACKGEGVKGCPDQDDWCKKTPCKCPAWSSTSECRCTQPCNPSCR	83	Este trabalho
Tx4_gauchaII	<i>L. gaucha</i>	ACKGEGVKG CYDKPDDWCKKTPCKCPAWSHERECRCTQPCARRCR	100	Este trabalho
Tx4_laetaI	<i>L. laeta</i>	ACKGEGVKG CYDKPDDWCKKTPCKCPAWSSSSECRCTQPCPRSCR	85	Este trabalho
Tx4_laetaII	<i>L. laeta</i>	ACKGEGVKE CYDKPDDWCKKTPCKCPAWSSSSECRCTQPCPRSCR	83	Este trabalho

O diagrama ilustra o alinhamento das sequências de aminoácidos. Os asteriscos (\*) indicam resíduos de cisteína conservados em todas as sequências. Os colchetes [ ] indicam as pontes dissulfeto estabelecidas entre os resíduos de cisteína correspondentes nas diferentes isoformas.

**Figura 17: Sequências codificantes de peptídeos do grupo LiTx4 encontradas para *L. gaucha* e *L. laeta* e comparação com isoformas preditas para *L. intermedia*.** Duas prováveis isoformas de LiTx4 foram encontradas para *L. gaucha* (Tx4\_gauchaI-II) e outras duas prováveis isoformas foram encontradas para *L. laeta* (Tx4\_laetaI-II). A sequência do peptídeo LiTx4 descrito em *L. intermedia* também compõe o alinhamento aminoacídico. Os resíduos de cisteína conservados são indicados por asteriscos e os resíduos que estabelecem as pontes dissulfeto que compõem o “nó inibidor de cistina” são indicados por colchetes.

## 5 DISCUSSÃO

A função biológica primordial dos venenos de aranhas é a promoção da defesa frente a predadores e a paralise e/ou morte de presas para a alimentação (WINDLEY *et al.*, 2012; SOLLOD *et al.*, 2005). Assim sendo, durante a evolução, as aranhas desenvolveram um arsenal de moléculas tóxicas em seus venenos, as quais têm afinidade por diversos alvos (canais iônicos, receptores específicos para neurotransmissores, membrana celular, etc). Exemplos de moléculas capazes de desempenhar as funções relatadas são os peptídeos da família ICK, toxinas amplamente encontradas nos venenos de aranha e que, em geral, apresentam massa molecular que varia de 3 a 15 kDa. Assim sendo, as bandas de grande intensidade verificadas no SDS-PAGE realizado refletem o grande conteúdo de peptídeos ICK presentes nos venenos testados. Esse resultado obtido está de acordo com dados da literatura, os quais revelam, por meio das mesmas análises qualitativas por eletroforese unidimensional, um enriquecimento de moléculas com massas correspondentes às dos peptídeos ICK em venenos provenientes de diversas espécies de aranhas (ESTRADA-GOMEZ *et al.*, 2013; BINFORD, 2001; GREMSKI *et al.*, 2014).

O imunoensaio de reatividade cruzada realizado entre um peptídeo ICK recombinante de *L. intermedia* (U2-SCTX-Li1b) e os antivenenos das 3 espécies em análise, sugeriu a existência de epítomos lineares nesse peptídeo que são reconhecidos por anticorpos anti-veneno de cada uma das espécies estudadas. Esse resultado reforça a ideia de que os peptídeos ICK compõem uma família conservada de toxinas dentro do gênero *Loxosceles*. Essa inferência é reforçada pelos achados relacionados com outras toxinas presentes no veneno de diferentes espécies do gênero *Loxosceles*, a exemplo das fosfolipases-D e metaloproteases. Diversos estudos identificaram e caracterizaram estruturalmente, bioquimicamente e biologicamente fosfolipases-D provenientes de diferentes espécies de aranhas *Loxosceles*, estabelecendo um consenso de que essas moléculas compõem uma família de toxinas conservadas no gênero (GREMSKI *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2005; FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2002; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2002). Outro exemplo evidente de família de toxinas conservadas no gênero é o das metaloproteases: Da Silveira e

colaboradores (2007a) obtiveram e caracterizaram uma isoforma de metaloprotease de *L. intermedia*, ao passo que Trevisan-Silva e colaboradores (2010) reportaram a identificação de mais duas isoformas de metaloproteases de *L. intermedia* e também a identificação de uma sequência codificante dessa toxina de *L. gaucho* e outra sequência de *L. laeta*.

Devido ao fato de muitos venenos apresentarem uma grande predominância de peptídeos ICK, muitos estudos proteômicos e peptidômicos têm sido realizados com o intuito de conhecer essas moléculas e verificar o potencial de cada uma delas para aplicação biotecnológica ou terapêutica. Entretanto, essas análises são frequentemente limitadas, uma vez que dependem de grande quantidade de veneno bruto e o rendimento das extrações costuma ser muito baixo. Além disso, dados proteômicos não refletem a totalidade de potenciais moléculas que são codificadas nas glândulas de veneno: Liao e colaboradores (2007) analisaram o veneno da tarântula chinesa *Chilobrachys jingzhao* por meio de métodos cromatográficos e de espectrometria de massas e identificaram apenas 60 peptídeos ICK; Cheng e colaboradores (2008), trabalhando com o mesmo veneno, identificaram 104 sequências codificantes de peptídeos ICK, o que representa 43% a mais de informação quando comparado ao primeiro estudo citado. Assim, estudos baseados no rastreamento de sequências codificadoras de peptídeos ICK, principalmente as abordagens de transcriptoma, têm sido frequentemente empregadas com o propósito de revelar o conteúdo de peptídeos dessa natureza nos venenos. Grande parte desses estudos confirmam a grande predominância dos transcritos referentes a peptídeos ICK em detrimento dos transcritos para as demais toxinas.

No presente estudo, todas as sequências novas rastreadas em *L. gaucho* e *L. laeta* apresentaram 10 resíduos de cisteína, assim como descrito para os peptídeos ICK de *L. intermedia* (GREMSKI *et al.*, 2010) e para os peptídeos ICK provenientes de outras famílias de aranha, a exemplo da família Oxyopidae. Além disso, todos esses resíduos estão dispostos em posição conservada, ou seja, não houve alteração do número de resíduos entre eles. Essa conservação no número e posição dos resíduos de cisteína entre as sequências obtidas e as anteriormente descritas para *L. intermedia* é um claro indicativo da relação estrutural e funcional existente entre esses peptídeos, o que já foi visto para

peptídeos ICK de outras famílias de aranhas: por exemplo, os peptídeos ICK descritos para aranhas da família Sparassidae caracteristicamente apresentam 6 resíduos de cisteína, bem como os da família Amaurobiidae apresentam 8 resíduos de cisteína (KUHN-NENTWIG *et al.*, 2011). Adicionalmente, por meio da ferramenta *online* KNOTTER 1D, disponível no banco de dados dos peptídeos ICK “Knotting Database”, foi verificado que todas as sequências conservam o arranjo do motivo estrutural ICK definido como C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> e C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, assim como já descrito para outros peptídeos, a exemplo da toxina ACTX-Hi:OB4219 da aranha australiana *Hadronyche infensa* (ROSENGREN *et al.*, 2002).

Kozlov e Grishin (2005), analisando a estrutura primária de vários peptídeos ICK com atividade biológica já comprovada, revelaram que as sequências aminoacídicas preditas podem fornecer importantes informações a respeito de suas funções. Segundo os autores, as sequências consenso denominadas “motivo estrutural principal” (MEP) e “motivo estrutural extra” (MEE) fornecem um indício confiável de atividade neurotóxica de inibição de canais iônicos nos peptídeos ICK que as contenham. O MEP é caracterizado pelo consenso C<sub>1</sub>X<sub>6</sub>C<sub>2</sub>UC<sub>3</sub>C<sub>4</sub> (C representa os resíduos de cisteína e o número associado representa a ordem desse resíduo na sequência primária do peptídeo; X indica qualquer aminoácido e o número associado representa a quantidade de resíduos entre as cisteínas), ao passo que o MEE é formado pelo consenso C<sub>5</sub>X<sub>1</sub>C<sub>6</sub> e C<sub>7</sub>X<sub>1</sub>C<sub>8</sub> (de acordo com as mesmas regras discriminadas para o MEE). Todas as sequências semelhantes a LiTx3 já descritas e também as encontradas no presente estudo contêm o MEP (figura 16), enquanto que as isoformas de LiTx1, LiTx2 e LiTx4 contêm o MEE (figuras 14, 15 e 17). Assim, baseado no que é proposto por Kozlov e Grishin (2005), após análise de múltiplas sequências, os peptídeos ICK de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* são potenciais moléculas a serem exploradas do ponto de vista biológico e biotecnológico.

Escoubas e colaboradores (2006), a partir dos venenos das tarântulas *Atrax robustus* e *Hadronyche versuta*, em análises de espectrometria de massas, verificaram a presença de aproximadamente 600 e 1000 peptídeos diferentes, respectivamente. Essa observação mostra a grande diversidade de moléculas nesses venenos, indicando a tradução efetiva de muita informação contida nos genes das células da glândula de veneno. Essa complexidade em termos proteicos é um reflexo da complexidade do que é codificado nos mRNAs

correspondentes. O rastreamento de transcritos nas espécies *L. gaucho* e *L. laeta* realizado revelou pela primeira vez a presença de sequências codificantes de peptídeos ICK para todos os grupos (LiTx1, LiTx2, LiTx3 e LiTx4) anteriormente descritos para *L. intermedia*. Certamente, o sequenciamento de um maior número de clones positivos para *L. gaucho* e *L. laeta* revelará uma diversidade ainda maior de sequências para peptídeos ICK.

Quanto ao grupo da LiTx1, o estudo prévio do transcriptoma de *L. intermedia* revelou a presença de duas prováveis isoformas, sendo uma delas a própria LiTx1 identificada por De Castro e colaboradores (2004) e outra isoforma contendo duas substituições aminoacídicas (GREMSKI *et al.*, 2010). Para *L. gaucho*, o resultado obtido foi semelhante ao descrito para *L. intermedia*, consistindo na identificação de duas prováveis isoformas: a própria LiTx1 e outra isoforma sutilmente diferente (duas substituições em relação à LiTx1). Isoformas muito semelhantes presentes no mesmo veneno são frequentemente relatadas na literatura. Vieira e colaboradores (2004) obtiveram cDNAs referentes a 3 peptídeos ricos em resíduos de cisteína codificados na glândula de veneno da caranguejeira *Lasiodora sp*; os peptídeos foram identificados como LTx1, LTx2 e LTx3 e a análises de suas sequências aminoacídicas preditas revelaram que tais peptídeos apresentam alta similaridade, diferindo um do outro em apenas 1 a 3 resíduos. Essas pequenas diferenças na estrutura primária dos peptídeos ICK podem ter diversos significados biológicos. Muitos trabalhos relatam que pequenas diferenças podem estar associadas com atividades biológicas muito distintas, enquanto outros suportam a ideia de que peptídeos com grande identidade estão associados com o mesmo alvo. Os peptídeos homólogos Magi5 e Magi11, derivados do veneno da aranha *Macrotheles gigas*, compartilham similaridade de 70% e induziram sintomas muito semelhantes quando injetados em camundongos, a exemplo de lacrimejamento, sugerindo similar modulação do sítio 4 de canais de sódio voltagem-dependentes (CORZO *et al.*, 2003; SATAKE *et al.*, 2004). Por outro lado, toxinas similares podem ter diferentes bioatividades, indicando que sutis diferenças na estrutura primária podem ser responsáveis por essa discrepância; exemplo disso são as toxinas HWTX-V e mHWTX-V isoladas a partir do veneno da aranha *Selenocosmia huwena*. mHWTX-V é uma versão natural truncada do peptídeo HWTX-V, diferindo apenas nos 2 últimos resíduos de aminoácidos na posição C-terminal. Embora

ambos os peptídeos sejam muito similares, mHWTX-V não foi capaz de induzir paralise e morte de gafanhotos e grilos, ao contrário de HWTX-V (ZHANG *et al.*, 2003). O estudo, por consequência, sugere que os aminoácidos fenilalanina e serina em posição C-terminal são resíduos-chave para a atuação desses peptídeos em seu alvo específico.

Para as sequências relativas ao grupo LiTx1 em *L. laeta*, 6 prováveis isoformas foram encontradas (Tx1\_laetal-VI). Levando em consideração apenas o grupo das LiTx1, esse resultado sugere que *L. laeta* e *L. gaucho* ao longo da evolução podem ter adotado estratégias diferentes para seu arsenal de toxinas: em *L. gaucho* as poucas isoformas presentes podem estar associadas com atividade promíscua, interagindo de forma menos específica com vários alvos. Em *L. laeta*, a grande diversidade de sequências sugere que cada uma possa estar relacionada com algum alvo em particular, ligando-se com grande afinidade a ele. Entretanto, a comprovação de tal hipótese depende de mais estudos bioquímicos, biológicos e toxicogenômicos.

A grande diversidade de isoformas verificada para o grupo dos peptídeos LiTx1 de *L. laeta* é hipotetizada como estratégia evolutiva de alguns venenos, os quais incluem diferentes formas de um peptídeo devido a uma ação sinérgica dessas. Além desta provável atuação somatória, uma gama maior de peptídeos semelhantes está relacionada como mecanismo de defesa biológico às variações físico-químico-biológicas do meio, a exemplo de estabilidade térmica, alterações de pH, ação de agentes desnaturantes e mutagênicos, as quais poderiam inibir ou degradar apenas algumas isoformas, ao passo que outras se manteriam estáveis, impedindo que alguma função importante seja perdida.

Em relação às sequências referentes aos peptídeos do grupo LiTx2, tanto em *L. gaucho* quanto em *L. laeta*, duas sequências com pequenas diferenças entre elas foram encontradas. Quando todas as sequências são comparadas em conjunto, inclusive as sequências de *L. intermedia*, verifica-se que as divergências estão confinadas a duas regiões específicas, sendo uma delas nas posições dos resíduos 11 a 14 e a outra nas posições dos resíduos 31 a 33. Essas divergências em regiões específicas podem estar associadas a alvos e/ou intensidades diferentes em relação a uma determinada atividade biológica. Satake e colaboradores (2004), estudando duas toxinas de *Macrotheles gigas* com alta similaridade (Magi15 e Magi16), verificaram que tais peptídeos

apresentavam diferenças moleculares significativas nos resíduos dispostos nas posições de 48 a 59; ensaios de microinjeção em grilos mostraram que as toxinas desencadeavam diferentes tipos de paralise nos insetos em análise: a toxina Magi15 gerava paralise prolongada por duas a três horas, não ocasionando morte aos insetos, ao passo que o peptídeo Magi16 originava uma paralise lenta após 5 ou 6 horas pós-injeção, resultando em morte tempo depois. A partir dessa observação, os autores hipotetizaram que a região de heterogeneidade na estrutura primária dos peptídeos possa estar relacionada com o perfil de toxicidade diferente resultante.

Ainda para o grupo dos peptídeos LiTx2, ambos os estudos em *L. intermedia* (DE CASTRO *et al.*, 2004; GREMSKI *et al.*, 2010) revelaram a presença de uma única sequência, indicando que essa isoforma em particular é bastante conservada no veneno. As sequências obtidas para *L. gaucho* e *L. laeta* revelaram maior diversidade, uma vez que apenas 10 clones foram sequenciados, entretanto, duas sequências foram identificadas para cada espécie em estudo.

Em relação aos peptídeos do grupo LiTx3, para *L. intermedia*, o trabalho do transcriptoma revelou uma grande diversidade de transcritos, os quais foram associados a possíveis 7 isoformas (GREMSKI *et al.*, 2010). Para *L. gaucho* e *L. laeta* foram encontradas duas sequências relacionadas ao grupo dos peptídeos LiTx3 em cada uma das espécies. As sequências de *L. gaucho*, assim como algumas descritas para *L. intermedia* (GRESMKI *et al.*, 2010; MATSUBARA *et al.*, 2013), diferem do peptídeo LiTx3 descrito por não apresentar a terminação composta pelo dipeptídeo lisina-glicina na região C-terminal. Esse dipeptídeo já foi relatado com um consenso para a ocorrência de amidação C-terminal, uma modificação pós-traducional associada com, aproximadamente, 12% dos peptídeos presentes em venenos de aranhas e que teria a função de proteger o peptídeo contra degradação proteolítica (SAEZ *et al.*, 2010; WINDLEY *et al.*, 2012). O mecanismo descrito especifica que o dipeptídeo citado sofreria clivagem proteolítica, resultando na remoção do resíduo de glicina e a subsequente amidação do resíduo de lisina (JOHNSON *et al.*, 1998). Os peptídeos TalTX-1, TalTX-2 e TalTX-3 da aranha *Tegenaria agrestis* e o peptídeo JZTX-IV da aranha *Chilobrachys jingzhao* possuem o mesmo consenso e, por meio de análise de espectrometria de massas, os autores presumem a

ocorrência da modificação pós-traducional relatada (JOHNSON *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2008). A literatura mostra que a amidação C-terminal parece ser importante para a atividade biológica dos peptídeos: Ostrow e colaboradores (2003), estudando a atividade do peptídeo GsMTx4 oriundo da tarântula *Grammostola spatulata*, verificaram que a forma recombinante do peptídeo em questão teve uma menor capacidade de inativar canais mecanossensitivos em relação à forma sintética e nativa da toxina, as quais possuíam a modificação. Assim, o fato de os peptídeos de *L. gaucho* não possuírem a sequência consenso de amidação sugere que estes possuam atividade biológica independente da modificação em questão.

Duas sequências codificantes dos peptídeos do grupo LiTx4 foram encontradas para cada espécie aqui estudada. O peptídeo LiTx4 descrito para *L. intermedia* ainda não foi caracterizado; sua sequência apenas foi depositada no *GenBank* por De Castro e colaboradores (2004). Gremski e colaboradores (2010) relataram que o peptídeo LiTx4 apresenta 77% de similaridade com o peptídeo LiTx2, indicando que tais peptídeos estão estruturalmente relacionados. A comparação das sequências de prováveis isoformas de LiTx4 obtidas para *L. gaucho* e *L. laeta* com as isoformas de LiTx2 derivadas de todas as três espécies revelou similaridade mínima de 78%, corroborando os dados obtidos por Gremski e colaboradores (2010) para *L. intermedia*. Essa alta similaridade entre os grupos LiTx2 e LiTx4 suscita a ideia de que todas as sequências obtidas possam corresponder a isoformas de peptídeos pertencentes a um mesmo grupo. Entretanto, tal inferência depende de mais análises genômicas e estruturais.

A análise geral das sequências de peptídeos ICK obtidas e a comparação com as sequências previamente identificadas para *L. intermedia* revelam que os peptídeos LiTx1, LiTx3 e LiTx4 são comuns a *L. gaucho* e *L. intermedia*. Nenhuma das sequências codificantes dos peptídeos descritos para *L. intermedia* foram encontradas para *L. laeta*. Esses resultados indicam uma similaridade maior entre os venenos de *L. gaucho* e *L. intermedia* no que se refere a peptídeos ICK, podendo essas espécies estarem filogeneticamente mais próximas em relação à espécie *L. laeta*. A presença de peptídeos ICK idênticos em venenos de espécies de aranhas diferentes já foi relatada na literatura, a



exemplo do peptídeo OxyTx1 que está presente tanto no veneno da aranha *Oxyopes lineatus* quanto em *Oxyopes kitabensis* (VILLEGAS *et al.*, 2008).

O rastreamento de sequências realizado permitiu identificar prováveis isoformas de peptídeos ICK até então desconhecidas em outras aranhas do gênero *Loxosceles*. Essas sequências constituem importantes informações que poderão ser exploradas por abordagens de biologia molecular e bioquímica de proteínas, a fim de caracterizar suas possíveis atividades biológicas e verificar suas potencialidades do ponto de vista biotecnológico e terapêutico.

**CAPÍTULO II**  
**CLONAGEM MOLECULAR, EXPRESSÃO  
HETERÓLOGA EM *Pichia pastoris* E  
CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE UM  
PEPTÍDEO ICK PRESENTE NO VENENO DE  
*L. intermedia***

## **CAPÍTULO II - CLONAGEM MOLECULAR, EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *Pichia Pastoris* E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE UM PEPTÍDEO ICK PRESENTE NO VENENO DE *L. intermedia***

### **1 INTRODUÇÃO**

O estudo de toxinas nativas animais é bastante dificultado pelo fato de que as extrações de veneno costumam ser de baixo rendimento. Em relação às aranhas do gênero *Loxosceles*, especificamente, o volume de veneno produzido pelas glândulas é variável de acordo com o espécime (tamanho, sexo e outros fatores), mas dificilmente ultrapassa 4µl e contém de 20µg a 200µg de proteínas totais (SAMS *et al.*, 2001; BINFORD; WELLS, 2003). O advento da biologia molecular, com os procedimentos de clonagem e expressão heteróloga de proteínas, facilitaram o estudo, uma vez que por meio dessas técnicas foi possível obter toxinas em quantidade razoável para análises bioquímicas, estruturais e biológicas (QUINTERO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

A expressão heteróloga de proteínas teve como primeiro modelo cepas da bactéria *E. coli*. Tal organismo apresenta muitas vantagens em relação aos demais modelos de expressão, a exemplo da genética bem conhecida e fácil manipulação, crescimento celular a partir de fontes de carbono de menor custo, rápido acúmulo de biomassa e processo de expressão mais simples e de maior controle. Entretanto, o modelo bacteriano apresenta a importante desvantagem de não propiciar/favorecer as modificações pós-traducionais, devido à ausência das organelas responsáveis por esses processos. A não ocorrência das modificações pós-traducionais pode gerar proteínas instáveis, insolúveis e inativas, inviabilizando o uso de células procarióticas como hospedeiras para a expressão heteróloga em alguns casos (BALAMURUGAN, REDDY, SURYANARAYANA, 2007, SAHDEV *et al.*, 2008).

Alternativamente às bactérias, muitos outros hospedeiros têm sido explorados para o processo de produção de proteínas recombinantes, como por

exemplo, fungos, células de inseto, a planta do tabaco, protozoários e células de mamíferos.

A levedura *Pichia pastoris* é um modelo muito utilizado como sistema de expressão eucariótico. Ela apresenta vantagens tanto sobre organismos procarióticos quanto organismos eucarióticos superiores. Ao contrário de sistemas de expressão procarióticos, essas leveduras são capazes de produzir modificações pós-traducionais em proteínas recombinantes, tais como a produção de pontes dissulfeto, o que favorece a estabilidade e a atividade das mesmas. Outros fatores que tornaram a *Pichia pastoris* um sistema de expressão popular incluem o AOX1, que é um dos promotores mais fortes e melhor regulado, a capacidade dessa levedura de integrar o plasmídeo de expressão em um ou mais sítios específicos do genoma e a existência de um kit comercial simples (Invitrogen) para realizar a transformação de vetores nesse tipo de levedura (BALAMURUGAN, REDDY, SURYANARAYANA, 2007).

O mecanismo de expressão de proteínas recombinantes em *Pichia pastoris* está relacionado com a expressão da enzima álcool oxidase, que pode ocorrer a partir da ativação dos promotores AOX1 ou AOX2. Esses genes são fortemente regulados e induzidos por metanol, quando este apresenta-se como única fonte de carbono para a célula. Por isso, esses promotores são utilizados amplamente em vetores de expressão para conduzir a obtenção da molécula recombinante de interesse. Desse modo, quando só resta o metanol como fonte de carbono no meio de expressão da *Pichia pastoris*, o promotor AOX1 e/ou AOX2 presente no vetor é ativado, liberando a expressão tanto da álcool oxidase quanto da proteína recombinante. A enzima irá utilizar o oxigênio molecular para oxidar o metanol a formaldeído e também eliminará o peróxido de hidrogênio, para minimizar os efeitos tóxicos para a célula, processo esse que ocorre nos peroxissomos. Assim, enquanto a levedura consome a fonte de carbono, a proteína recombinante também é expressa (KRAINER *et al.*, 2012).

Os peptídeos ICK são ricos em resíduos de cisteína, os quais estabelecem pontes dissulfeto intramoleculares. Assim, o modelo de *Pichia pastoris* é ideal para expressão de tais moléculas, uma vez que alia baixos custos para a produção com o favorecimento das modificações pós-traducionais necessárias para o estabelecimento da conformação molecular correta.

Este capítulo aborda a clonagem molecular, a expressão heteróloga de um peptídeo ICK presente no veneno de *L. intermedia* em *P. pastoris* e ensaios de caracterização biológica dessa molécula.

## 2 OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

- Obter um peptídeo recombinante da família ICK presente no veneno de *Loxosceles intermedia* (expresso em *Pichia pastoris*) e caracterizar sua atividade biológica.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar a sequência do peptídeo U2-SCTX-Li1b em vetor de expressão em *Pichia pastoris* (pPICZαC);
- Expressar o peptídeo em questão em cepas da levedura *P. pastoris* (X-33, KM71H e GS115) e purificá-lo;
- Verificar a atividade biológica do peptídeo U2-SCTX-Li1b por meio de ensaios *in vivo*, em insetos, e *in vitro*, em cultura de células.

### 3 METODOLOGIA

#### Clonagem Das Diversas Formas Do Peptídeo U2-SCTX-Li1b Em Vetor De Expressão Em *Pichia pastoris* pPICZαC.

Durante o período do presente estudo, várias formas do peptídeo U2-SCTX-Li1b foram produzidas de acordo com os resultados obtidos a cada etapa. Essas formas são especificadas abaixo:

FORMAS DO PEPTÍDEO U2-SCTX-Li1b PRODUZIDAS	IDENTIFICAÇÃO DA FORMA PRODUZIDA
<b><u>Pró-forma Não-otimizada do Peptídeo</u></b> (sequência do propeptídeo associada à sequência madura não-otimizada em termos de códons)	pro-U2-SCTX-Li1b
<b><u>Pró-forma Otimizada do Peptídeo</u></b> (sequência do propeptídeo associada à sequência madura otimizadas em termos de códons)	pro-U2-SCTX-Li1b otimizado
<b><u>Peptídeo Maduro Otimizado</u></b> (somente a sequência madura otimizada do peptídeo)	U2-SCTX-Li1b
<b><u>Peptídeo Maduro Mutado</u></b> (sequência madura otimizada com a mutação no resíduo de número 5 - troca de serina por tirosina)	U2-SCTX-S5Y
<b><u>Peptídeo Maduro Com <i>histag</i> N-terminal</u></b> (sequência madura otimizada com a mutação S5Y, com o <i>histag</i> em posição N-terminal)	U2-SCTX-N-his

**Tabela 3: Designação das formas recombinantes produzidas no presente estudo.**

A sequência codificante da pró-forma do peptídeo sem otimização dos códons (pro-U2-SCTX-Li1b) foi amplificada a partir da construção U2-SCTX-Li1b/pET-14b (MATSUBARA *et al.*, 2013); a sequência codificante da pró-forma

do peptídeo com os códons otimizados (pro-U2-SCTX-Li1b otimizado) foi sintetizada pela empresa GenScript USA inc. (Piscataway, NJ); a sequência codificante da forma madura do peptídeo (U2-SCTX-Li1b) foi obtida a partir de amplificação que teve como molde a sequência otimizada descrita acima; a sequência codificante do peptídeo maduro com a mutação S5Y (U2-SCRTX-S5Y) foi amplificada a partir da construção U2-SCTX-Li1b/pPICZ $\alpha$  C; a sequência codificante do peptídeo U2-SCRTX- N-his foi sintetizada e clonada no vetor pPICZ $\alpha$  C pela empresa GenScript USA inc. (Piscataway, NJ, EUA).

As reações de PCR foram realizadas em tubos contendo o par de primers específicos (0,4  $\mu$ M), tampão para Pfu DNA polimerase(1x), DNA molde, dNTP mix (0,2 mM) e Pfu DNA Polimerase (1,25 U/ $\mu$ L). Os primers utilizados para a amplificação dos insertos específicos continham sítios de restrição para as enzimas ClaI e XbaI, os quais foram utilizados para a clonagem direcional dos fragmentos no vetor pPICZ $\alpha$ C (Invitrogen) de acordo as recomendações do fabricante.

A análise dos produtos de PCR foi realizada por meio de gel de agarose 1,5%. Em seguida, a banda amplificada correspondente ao peptídeo a ser clonado foi recortada para a extração do DNA, com a utilização do kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA). Após a gel extração, as amostras de DNA foram submetidas à leitura espectrofotométrica (A260/280) no aparelho NanoVue Plus® (GE Healthcare Life Sciences) para a determinação da concentração e do grau de pureza das mesmas (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

As sequências obtidas foram submetidas à digestão com as enzimas de restrição ClaI e XbaI (Thermo Scientific) por 16 h a 37°C. Em seguida, as amostras foram analisadas em gel de agarose 1,5% para avaliar o sucesso dessa reação. A partir das bandas obtidas, foi realizada a purificação, dosagem, e avaliação do DNA quanto ao grau de pureza, como descrito acima. Posteriormente, foi realizada a ligação da sequência amplificada em vetor pPICZ $\alpha$ C (Invitrogen) previamente digerido pelas mesmas enzimas de restrição ClaI e XbaI. A reação de ligação foi realizada a 22°C, durante 16 h, e continha tampão para a enzima T4 DNA ligase (1x), T4 DNA ligase (3 U/ $\mu$ L) (Invitrogen) e inserto e vetor na proporção 3:1 (inserto:vetor) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).



## **Transformação Das Construções U2-SCRTX-S5Y/ pPICZαC Em *E. coli* TOP10F' Por Eletroporação**

As construções foram transformadas em cepa de clonagem *E. coli* TOP10F' (Invitrogen) por eletroporação através do aparelho Gene Pulser X-Cell® (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) nas condições de 1.8kV, 25MF, 200%. Em seguida, as bactérias foram ressuspensas em meio LB low-salt (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 5 g/L) e incubadas a 37°C, por 1 h, sob rotação de 200 rpm, para o processo de recuperação das células. Após, as mesmas foram plaqueadas em meio LB-ágar low-salt (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 5 g/L, agar-ágar 15 g/L) suplementado com zeocina (25 µg/mL) (Invitrogen) e tetraciclina (10 µg/mL) (Invitrogen) (Sambrook & Russel, 2001).

### **PCR De Colônia**

As colônias obtidas após a etapa de transformação foram selecionadas aleatoriamente para a realização de PCR de colônia, a fim de identificar as bactérias que realmente possuíssem as construções de interesse. Às colônias selecionadas foram adicionados: tampão Taq DNA polimerase (1x), dNTPs (0,2 mM), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), oligonucleotídeos iniciadores sense e antisense do vetor pPICZαC (Invitrogen) descritos no item 4.2.1 (0,2 µM), e Taq DNA Polimerase (1,25 U/µL). Após o preparo dessas amostras, as mesmas foram incubadas em um termociclador MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) para a amplificação do inserto sob as condições: 95°C/ 5 min (1ciclo); 95°C/ 30 s – 55°C/ 30 s – 72°C/ 1 min (35 ciclos); 72°C/ 10 min (1ciclo); 4°C infinito. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1,5% e os resultados foram visualizados e registrados em aparelho de captura de imagem Chemidoc (Bio-Rad).

## **Miniprep, PCR De Sequenciamento E Sequenciamento Dos Insertos**

Para a realização do PCR de sequenciamento foi necessário obter as construções por meio de procedimento de minipreparação. Para isso foram preparados pré-inóculos contendo, em cada um, 10 ml de meio LB low-salt (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 5 g/L), zeocina (25 µg/mL) (Invitrogen) e tetraciclina (10 µg/mL) (Invitrogen). Os mesmos permaneceram sob incubação por 16 h a 37°C e 200 rpm de agitação. Após, foi realizada a extração das construções através do kit para mini-extração plasmidial Pure Link Quick Plamid Miniprep Kit® (Qiagen). A concentração e o grau de pureza do produto obtido foi avaliado em NanoVue Plus® (GE Healthcare Life Sciences) (Sambrook & Russel, 2001).

Às construções obtidas foram adicionados os primers que anelam em porções do vetor pPICZαC (Invitrogen) (primer forward α-factor ou primer reverse 3' AOX) e o reagente BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies). Em seguida, foi feito o PCR de sequenciamento em termociclador MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) de acordo com os seguintes ciclos: 95°C/ 20 min - 50°C/ 15 s - 60°C/ 4 min (35 ciclos); 4°C infinito (ciclo de espera). Posteriormente, os produtos de PCR foram precipitados com acetato de sódio-EDTA e etanol (0,1v:3v), secos à temperatura ambiente, ressuspensos em formamida e sequenciados em aparelho ABI PRISM 3500 Genetic Analyser (Life Technologies). Os resultados dos sequenciamentos foram analisados por meio do software FinchTV para a verificar se a fase de leitura estava correta e se as sequências de cada construção estavam integras e sem mutações indesejadas.

## **Subclonagem Das Construções inserto/pPICZαC Em *Pichia pastoris***

Após a confirmação da integridade das sequências e da correta fase de leitura, foi realizada a linearização das construções para que estas pudessem ser integradas ao DNA de *Pichia pastoris*. Para isto, foi realizada a linearização na região 5' do promotor da álcool oxidase 1 (AOX1), presente na construção, através da incubação com a enzima de restrição SacI (Fermentas), durante 16

h, a 37°C. Após a precipitação e secagem dessas amostras, as mesmas foram ressuspensas em água deionizada para avaliação do grau de pureza no aparelho NanoVue Plus® (GE Healthcare Life Sciences).

Aproximadamente 10 µg de cada construção linearizada foi utilizada no processo de transformação em *Pichia pastoris* X33 (Invitrogen) quimicamente competentes, que foi realizado através do kit comercial “Pichia Easy Comp Kit” (Invitrogen). Em seguida, as células transformadas foram selecionadas em meio YPDS-ágar (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glucose 2%, sorbitol 1M, ágar 2%) contendo zeocina (100 µg/mL) (Invitrogen). As placas foram incubadas por um período de 3 a 10 dias, a 30°C.

### **Teste De Expressão Dos Peptídeos Em *Pichia pastoris* X33**

Para a padronização das condições ótimas de expressão do peptídeo em larga escala primeiramente foram realizados testes de expressão (mini-expressão). Uma colônia de *P. pastoris* da placa de transformação, escolhida de forma aleatória, foi utilizada para inocular 25mL de meio BMGY (peptona 2%; extrato de levedura 1%; fosfato de potássio 100mM, pH 6,0; YNB 1,34%; biotina 4x10<sup>-5</sup>%; glicerol 1%), o qual foi incubado por 16 horas, a 30°C, sob agitação de 200 rpm. Após o tempo especificado, o pré-inóculo foi diluído em 100mL de meio BMGY e a cultura incubada até atingir a D.O.<sub>600</sub> de 2-6. As células foram então recuperadas por centrifugação por 5 minutos a 4000xg, à temperatura ambiente. A fase solúvel da centrifugação foi descartada e as células foram ressuspensas em 100mL de meio BMMY (peptona 2%; extrato de levedura 1%; fosfato de potássio 100mM, pH 6,0; YNB 1,34%; biotina 4x10<sup>-5</sup>%; metanol 0,5%). A indução da expressão do peptídeo recombinante foi realizada através da incubação das culturas por 96 horas a 15°C ou 30°C sob agitação de 200 rpm. A indução foi mantida pelo acréscimo de metanol para uma concentração final de 0,5%, 1% ou 3% a cada 24 horas de incubação.

## **Expressão Do Peptídeo Recombinante Em *Pichia Pastoris***

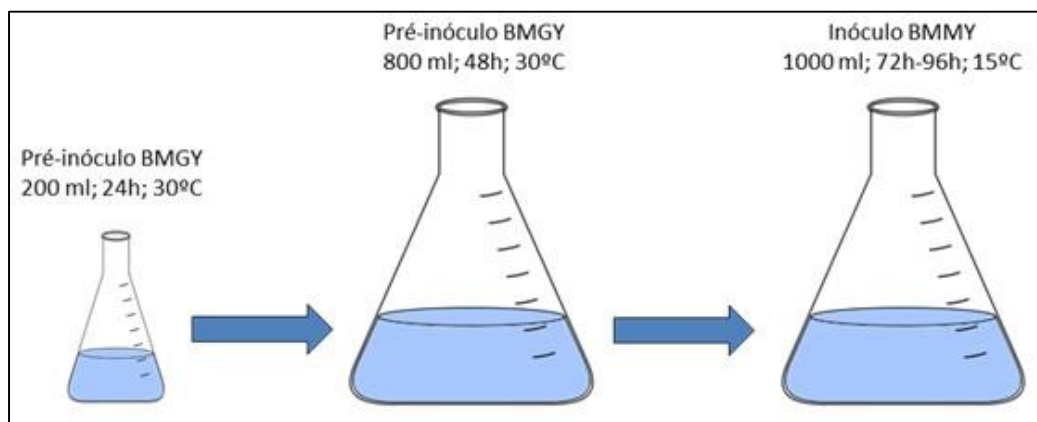
A expressão do peptídeo recombinante em larga escala nas cepas X-33 e GS115 foram conduzidas de acordo com 2 protocolos diferentes: o protocolo convencional, sugerido pelo do manual do fornecedor do kit de transformação (Invitrogen) (disponível em <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/V19520>) ou o protocolo em alta densidade, modificado a partir do trabalho de Anangi e colaboradores (2011).

O protocolo convencional é semelhante ao descrito acima para o teste de expressão, exceto pelos volumes do pré-inóculo (250 ml) e do inóculo (1000 ml).

O protocolo de alta densidade foi realizado da seguinte forma: uma colônia de *P. pastoris* da placa de transformação, escolhida de forma aleatória foi utilizada para a realização de um pré-inóculo contendo 250 mL de meio, o qual foi incubado por 24 h a 30°C e 225 rpm. Após esse período, as células do pré-inóculo foram centrifugadas e ressuspensas em um pré-inóculo maior, contendo 1000 mL de meio BMGY; em seguida, o pré-inóculo maior foi dividido em duas partes iguais em erlenmeyers de 2000 mL e os mesmos foram incubados por 48 h, a 30°C e 225 rpm. Depois desse intervalo, foi realizada outra centrifugação e as células foram ressuspensas em um inóculo contendo 1000 mL de meio BMMY; o inóculo foi dividido em duas partes iguais em erlenmeyers de 2000 mL e incubados a 15°C, 225 rpm, durante 72 h, sendo suplementadas para a indução da expressão a cada 24 h. Nas primeiras 24 h essa indução foi realizada com 0,5% metanol, enquanto que nas 48 h seguintes a suplementação ocorreu com 1% metanol.

Ao final da expressão, as culturas foram centrifugadas por 5 min a 9000 xg a temperatura ambiente. As proteínas presentes na fase solúvel de cada cultura foram submetidas à precipitação pela adição de sulfato de amônio a 80% de saturação (500 g a cada 1000 ml de expressão) seguida de centrifugação por 20 min a 9000 xg a 4°C. Os precipitados obtidos após a centrifugação foram ressuspensos em 10 mL de tampão fosfato (fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, cloreto de sódio 500 mM), com posteriores diálises contra o mesmo tampão. A série de diálises foi composta por duas etapas de 2 h, seguida de uma etapa de 16h, a 4°C. Após as diálises, à cada amostra foi adicionado imidazol para

concentração final de 10 mM, visando a posterior ligação em resina de Ni-NTA Agarose (Qiagen).

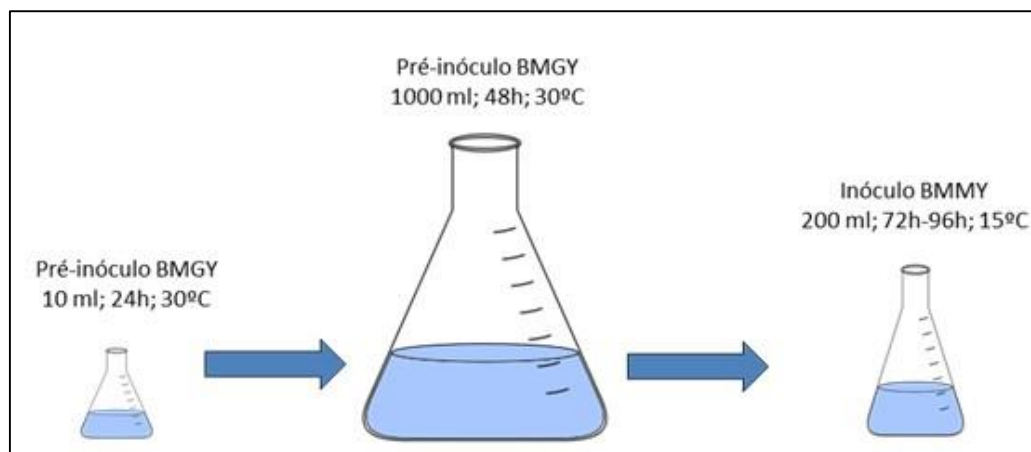


**FIGURA 18. Esquema demonstrando a dinâmica de expressão do peptídeo em *Pichia pastoris* X33 de acordo com o protocolo de alta densidade (modificado a partir de Anangi *et al.*, 2011).**

Para a expressão do peptídeo recombinante na cepa de *P. pastoris* KM71H o seguinte protocolo foi realizado: uma colônia isolada foi utilizada para realizar um pré-inóculo contendo 125 mL de meio BMGY (peptona 2%; extrato de levedura 1%; fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0; YNB 1,34%; biotina  $4 \times 10^{-5}\%$ ; glicerol 1%), o qual foi incubado por 16 h, a 30°C e 225 rpm. Após esse período, as células do pré-inóculo foram centrifugadas e ressuspensas em um pré-inóculo maior, contendo 1000 mL de meio BMGY, em seguida, este foi dividido em duas partes iguais em erlenmeyers de 2000 mL de capacidade, os quais foram incubados por 24 h, a 30°C e 225 rpm. Depois desse intervalo, foi realizada outra centrifugação e as células foram ressuspensas para compor um inóculo de 200 mL de meio BMMY, em um erlenmeyer de 1000 mL de capacidade; o inóculo foi incubado a 15°C e 225 rpm, durante 6 dias e suplementado para a indução da expressão com 0,5% metanol.

Ao final da expressão, a cultura foi centrifugada por 5 min a 9000xg, à temperatura ambiente. As proteínas presentes na fase solúvel de cada cultura foram submetidas à precipitação pela adição de sulfato de amônio a 80% de saturação (500 g a cada 1000 mL de expressão) seguida por 20 min de centrifugação a 9000 xg a 4°C. Os precipitados obtidos foram ressuspensos em 10 mL de tampão fosfato (fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, cloreto de sódio 500 mM), com posteriores diálises contra o mesmo tampão. A série de diálises

foi composta por duas etapas de 2 h, seguida de uma etapa de 16 h, a 4°C. Após as diálises, à cada amostra foi adicionado imidazol para concentração final de 10mM, para a posterior ligação em resina de Ni-NTA Agarose (Qiagen).



**FIGURA 9:** Esquema demonstrando a dinâmica de expressão do peptídeo em *Pichia pastoris* KM71H de acordo com o protocolo proposto pelo kit de transformação “Pichia Easy Comp Kit” (Invitrogen).

### **Purificação Dos Peptídeos Recombinantes Por Cromatografia De Afinidade Em Resina De Ni-NTA Agarose**

O material dialisado na etapa anterior foi incubado com resina de Ni-NTA Agarose (Qiagen) previamente equilibrada com tampão de ligação (fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, cloreto de sódio 500 mM e imidazol 10 mM) por 1 h a 4°C sob agitação suave. Posteriormente, cada amostra foi submetida a sucessivas lavagens com tampão de lavagem (fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, cloreto de sódio 500 mM, imidazol 20 mM). Por fim, os peptídeos recombinantes foram eluídos com tampão de eluição (fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, cloreto de sódio 500 mM, imidazol 250 mM).

## **Eletroforese De Proteínas Em Gel Desnaturante De Poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Para avaliar os produtos da expressão, foram realizadas eletroforeses em géis de poliacrilamida (18%) contendo detergente aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE), em condições redutoras e não-redutoras. Os géis foram preparados utilizando o aparato comercial (Bio-Rad Laboratories) e solução de poliacrilamida contendo os catalisadores APS e TEMED. A solução de empacotamento utilizada continha 5% de poliacrilamida e os catalisadores. A separação das proteínas foi obtida através da corrente de 25 mA constante, até a separação total das mesmas. Os géis foram corados em solução contendo Azul de Coomassie Brilhante R-250 a 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10% em água deionizada, durante 10min à temperatura ambiente sob agitação constante. A descoloração foi realizada com metanol 50% em água deionizada, com sucessivas trocas da solução de metanol (HARLOW, LANE, 1988).

## **Dosagem De Proteínas**

A dosagem do peptídeo expresso foi realizada pelo método adaptado de Bradford (1976), em leitor de microplacas (Meridian ELX 800). Esse método se baseia na diferença de coloração em que o Azul de Coomassie pode se encontrar. Quando esse reagente se liga às proteínas, o mesmo passa da coloração vermelha para azul, sendo sua absorbância determinada em 595 nm. A curva padrão foi construída com diferentes quantidades (0,25 µg – 2,00 µg) de Soro de Albumina Bovina (BSA) e as amostras foram diluídas para que se tornassem compatíveis com a linearidade da curva. O volume total de cada ponto da curva e das amostras foi de 20 µL. O reativo para dosagem de proteínas Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) foi diluído em água na proporção 1:4. Foram adicionados 200 µL do reativo diluído em cada ponto da curva e nas amostras, a placa foi incubada por 5 min e, posteriormente, as absorbâncias foram determinadas em 595 nm. Os pontos da curva e as amostras foram lidos em duplicata, sendo que o coeficiente de determinação aceitável da curva de BSA foi  $R^2 > 0,99$ .

## **Imunoensaios De *Western Blotting***

O imunoensaio de western blotting foi realizado com o intuito de identificar a presença dos peptídeos após a expressão em larga escala e para avaliar se os mesmos encontravam-se bem purificados. Para isso, foi realizada uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 18% (SDS-PAGE) com a amostra proveniente da purificação; em seguida, os peptídeos foram transferidos para membranas de nitrocelulose por 1 h a 100V.

Na sequência, as membranas foram bloqueadas por 2 h com leite desnatado em pó diluído Molico® (Nestlé) em PBS (NaCl 100 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM - pH 7,4) 3% (p/v). O anticorpo primário  $\alpha$ -Histag (GE Healthcare Life Sciences), que reconhece a sequência de 6 histidinas inserida nos peptídeos recombinantes, foi diluído (1:5000) na mesma solução de bloqueio. A membrana de nitrocelulose foi incubada nesta solução por 2 h à temperatura ambiente sob constante agitação e, posteriormente, a mesma foi lavada com o mesmo tampão na ausência de anticorpos e incubada com o anticorpo secundário IgG ( $\alpha$ -IgG de camundongos, que reconhecem o  $\alpha$ -Histag produzido em camundongos, na diluição de 1:10.000) conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se a etapa de revelação por meio da reação com o substrato BCIP e o cromógeno NBT (Promega, Madison, USA) em tampão ótimo para atividade de fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM - pH 9,5; NaCl 100 mM e MgCl<sub>2</sub> 5 mM).

## **Ensaio De Deglicosilação Do Peptídeo U2-SCTX-S5Y**

A n-deglicosilação do peptídeo U2-SCTX-S5Y foi realizada através da enzima n-glicosidase. Enquanto que a o-deglicosilação foi realizada por beta eliminação, catalisada por base em condições redutoras. O peptídeo foi adicionado a uma solução contendo 0,2 M de NaOH e 1 % de NaBH<sub>4</sub>. Esta reação ficou incubando a 4°C overnight e posteriormente foi neutralizada com ácido clorídrico 1 M. Em seguida o resultado foi analisado por SDS-PAGE 15%.



## Ensaio De Atividade Inseticida

Grilos adultos, tenébrios e larvas da laranja foram injetados intratoraxicamente, entre o segundo e o terceiro par de pernas, com uma solução contendo o peptídeo recombinante em diferentes concentrações (5 – 100 µg do peptídeo recombinante em massa) diluído em PBS. Foram usados três grupos com cinco animais para cada teste. O grupo controle negativo foi injetado apenas o veículo (PBS) e o grupo controle positivo foi tratado com veneno bruto de *L. intermedia*. Os animais foram observados em diversos intervalos de tempo após a injeção, determinando o tempo de 72 h como o final da análise. Animais mortos ou incapazes de se desvirarem quando colocados com o dorso no chão foram descartados. (Escoubas *et al.*, 1995).

## Cultivo Celular E Ensaio De Viabilidade Com Azul De Trypan

Células da linhagem SH-SY5Y de neuroblastoma humano foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 20% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e penicilina (5000 U/L) e estreptomicina (5000 µg/L), a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. As células da linhagem N<sub>2</sub>A de neuroblastoma murino foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% (v/v) de SFB, ácido pirúvico (1mM) e penicilina (5000 U/L) e estreptomicina (5000 µg/L), e incubadas da mesma forma que as células da linhagem SH-SY5Y. Ambas as linhagens utilizadas foram adquiridas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Para verificar a porcentagem de células viáveis após tratamento com a toxina, foi realizado o ensaio com o corante azul de Trypan. Para isso, 5 x 10<sup>4</sup> células foram plaqueadas em placa de 24 poços e incubadas por 24 h para aderência das mesmas. Procedeu-se então o tratamento das células com diferentes concentrações dos peptídeos recombinantes por 24 h; veneno total de *L. intermedia* foi utilizado como controle positivo e o veículo (PBS) foi utilizado como controle negativo. Após o tempo de tratamento, as células foram soltas com auxílio de *scraper* e o corante azul de Trypan foi adicionado para uma diluição final de 0,04%. Em seguida, as células foram contadas com auxílio de Câmara de Neubauer. Os resultados foram submetidos

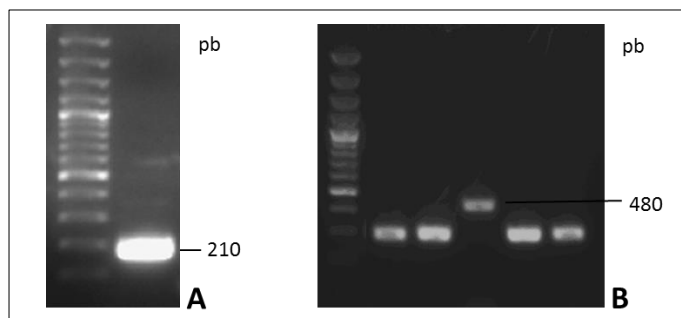
à análise estatística, sendo as repetições e o tratamento avaliados. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA - duplo sem repetição); e para avaliar as diferenças entre os tratamentos e controle foi utilizado o teste de Tuckey que permite estabelecer a diferença mínima significativa entre duas médias. A significância foi definida como  $p < 0,01$ .



## 4 RESULTADOS

O peptídeo recombinante U2-SCTX-Li1b foi anteriormente obtido a partir de expressão heteróloga em modelo procarioto (*E. coli* AD494 (DE3)) (MATSUBARA *et al.*, 2013), entretanto sua atividade biológica não foi caracterizada. Os autores hipotetizaram que a não verificação de atividade poderia estar associada com a estrutura incorreta do peptídeo, uma vez que bactérias não possuem sistema de endomembranas capaz de promover a realização de modificações pós-traducionais, a exemplo das pontes dissulfeto. Dessa forma, optou-se pela produção do peptídeo em modelo eucarioto (*Pichia pastoris*), capaz de estabelecer as modificações adequadas, com objetivo de obtê-lo com a conformação adequada e, assim, testar sua atividade.

Para dar início aos procedimentos de clonagem da sequência do peptídeo em vetor de transformação em *Pichia pastoris*, a amplificação *in vitro* da sequência referente ao peptídeo U2-SCTX-Li1b precedida pelo seu propeptídeo (pro-U2-SCTX-Li1b) foi realizada por meio de PCR utilizando como molde uma construção prévia dessa sequência clonada no vetor de expressão em bactérias pET-14b (MATSUBARA *et al.*, 2013). Essa amplificação foi realizada com a utilização de primers específicos para a sequência em questão contendo sítios de restrição para as enzimas *ClaI* e *XbaI* e resultou na visualização de um produto amplificado contendo, aproximadamente, 210 pares de base (pb) por meio de eletroforese em gel de agarose (figura 20A).

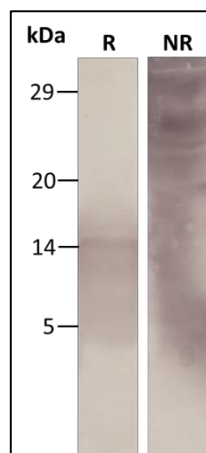


**FIGURA 20: ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA E DO PCR DE COLÔNIA REFERENTE AO PEPTÍDEO pro-U2-SCTX-Li1b (gel de agarose 1,5%).** (A) Amplificação da sequência do peptídeo pro-U2-SCTX-Li1b. Verificou-se a presença de uma banda específica em aproximadamente 210pb. (B) PCR de colônia. Gel representativo de 5 clones testados. O clone positivo demonstrou a banda na altura aproximada de 480pb, sendo 210 relativos ao inserto e 270 referentes às porções do vetor amplificadas.

O produto amplificado foi extraído do gel, digerido com as enzimas já mencionadas e ligado ao vetor pPICZαC para expressão em *Pichia pastoris*. Essa construção gerada foi então transformada em cepa de clonagem *E. Coli* TOP 10F' e um clone recombinante positivo foi obtido, como pode ser observado no gel realizado após PCR a partir das colônias de bactérias crescidas na placa de transformação (figura 20B). O clone positivo foi submetido a minipreparação para a extração do plasmídeo e sequenciamento, o qual verificou que a sequência clonada estava em fase com o fator de secreção α N-terminal e com o epítipo c-Myc e a cauda de poli-histidina C-terminais, além de indicar ausência de mutações na sequência. Uma alíquota contendo 10 ug da construção isolada foi então linearizada com a enzima SacI e transformada com a utilização do kit *Pichia* EasyComp™ Kit em cepa de levedura *Pichia pastoris* X-33 de acordo com as recomendações do fabricante. Os clones positivos de *P. pastoris* foram obtidos mediante seleção pelo antibiótico zeocina (100 ug/ml).

Um dos clones positivos foi selecionado para um teste em pequena escala com o intuito de avaliar e otimizar as condições de expressão. Esse teste foi realizado em 100 ml de meio BMMY, com 0,5% do indutor metanol (indutor adicionado a cada 24 horas durante os dias de expressão), à temperatura de 30° C, por 4 dias. Ao término do quarto dia de expressão, o sobrenadante da cultura foi submetido à precipitação por sulfato de amônio (90%) e diálise em tampão de ligação à resina de purificação Ni-NTA agarose. A purificação rendeu 55 ug do

peptídeo purificado, sugerindo um baixo rendimento sob as condições utilizadas durante a expressão. O peptídeo recombinante eluído foi submetido à análise por *western blotting* com a utilização de anticorpo primário anti-histag em duas diferentes condições: redutora (presença do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol) e não-redutora (ausência do referido agente redutor). Como pode ser observado na figura 6, sob condição redutora, uma única banda difusa foi verificada, na altura aproximada de 14 kDa, indicando a forma monomérica do peptídeo expresso. Entretanto, sob condições não-redutoras, observou-se uma grande variedade de bandas, representada por um grande arrastado, indicando formas com dobramento incorreto (peptídeos com estabelecimento incorreto das pontes dissulfeto) e agregação do peptídeo expresso (prováveis formas diméricas, triméricas, etc) (figura 21).



**FIGURA 21: ANÁLISE POR WESTERN BLOTING DO PEPTÍDEO RECOMBINANTE PURIFICADO EXPRESSO EM CEPA DE *P. pastoris* X-33.** Verificou-se um perfil diferente sob as condições redutoras (R) e não-redutoras (NR) de amostras do peptídeo, indicando dobramento incorreto e agregação do peptídeo expresso.

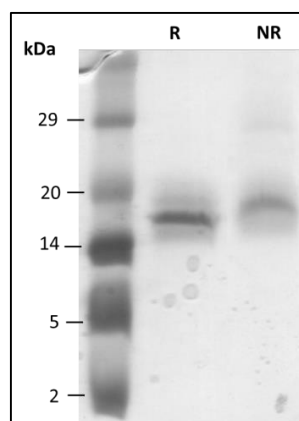
Devido ao baixo rendimento de expressão verificado no teste anteriormente descrito, optou-se pela síntese da sequência do peptídeo com otimização de codons para a expressão em *P. pastoris*; a sequência codificante da pró-forma do peptídeo com os códons otimizados foi sintetizada e clonada no vetor pPICZ $\alpha$  C pela empresa GenScript USA inc. (Piscataway, NJ). A otimização resultou na substituição de 38 codons na sequência do peptídeo, o que representa aproximadamente 57,5% dos codons totais (figura 22).

Original	GAAGAGGTGATTGAAAGTGACATCGAACCAGCTGAAAGAGGATGCATTAAATCTGGTCAG
Otimizada	GAAGAGGTCATTGAATCAGACATTGAGCCAGCAGAGAGAGGTTGTATTAAAAGTGGTCAG
Original	CGATGTGGCAGTCTCATGGACTGCCGTCAAATTGTTGTGATGATTGGAAATACAAGGGA
Otimizada	AGATGCGGTAGTCCACACGGTTTGCCATCTAACTGTGCGATGACTGGAAGTACAAAGGT
Original	AGATGCGGTTGCACAATGGGGGTGTGCACCTGTGGCAAAAAATTGTCCAAGTAGAGGATGT
Otimizada	AGATGTGGATGCCTATGGGTGTTTGTACCTGCGGAAAGAATTGTCCATCCAGAGGTTGT
Original	GACTATAGAACAAAAGGT
Otimizada	GATTATAGAAGTAAAGGA

**FIGURA 22: SEQUÊNCIAS DOS PEPTÍDEOS pro-U2-SCTX-Li1b ORIGINAL E DO PEPTÍDEO COM CÓDONS OTIMIZADOS PARA A EXPRESSÃO EM *P. pastoris*.** Em vermelho estão representados os códons otimizados.

A sequência otimizada clonada em vetor pPICZαC foi transformada em cepa de *E. coli* TOP10 F', seguido de minipreparação de plasmídeo para obtenção de massa suficiente para a transformação de cepa de *P. pastoris* X-

33. Novamente, clones positivos de *P. pastoris* foram selecionados em placa seletiva contendo o antibiótico zeocina (100 ug/ml) e um desses clones foi utilizado para teste de expressão em pequena escala. Nesse teste, o parâmetro temperatura de expressão foi alterado para 15°C, diferentemente do primeiro teste de expressão, no qual a temperatura utilizada foi de 30°C. Como pode ser observado na figura 8 abaixo, a expressão da sequência otimizada à 15°C, seguida de posterior purificação por cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA agarose, resultou na obtenção do peptídeo recombinante predominantemente na sua forma monomérica (1,1 mg por litro de BMMY), o que pode ser deduzido a partir da análise por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida que revelou uma banda marcante tanto sob condição redutora, quanto em condição não-redutora (figura 23).



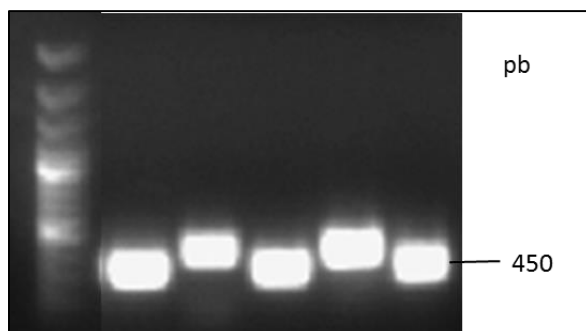
**FIGURA 23: ANÁLISE POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DO PEPTÍDEO RECOMBINANTE PURIFICADO EXPRESSO EM CEPA DE *P. pastoris* X-33.** Verificou-se perfis semelhantes do peptídeo recombinante sob condições redutoras (R) e não-redutoras (NR), indicando que o peptídeo se encontrava em sua forma monomérica.

Uma vez que o peptídeo produzido se encontrava em sua forma monomérica, sugerindo que a conformação correta havia sido obtida, procederam-se ensaios preliminares de atividade biológica. Para a verificação da possível atividade inseticida, exemplares de grilos (*Gryllus sp.*) (5 para cada tratamento) foram injetados com diferentes massas do peptídeo pro-U2-SCTX-Li1b (5 µg, 15 µg, 30 µg e 50 µg). Veneno total de *L. intermedia* foi usado como controle positivo (2 ug), enquanto que o veículo (PBS) foi utilizado como controle negativo. O peptídeo pro-U2-SCTX-Li1b injetado, mesmo na mais alta massa inoculada, não causou nenhum efeito de parálise ou letalidade aos espécimes de grilo mesmo após 72 horas pós-injeção; para os espécimes inoculados com veneno total foi verificada 100% de morte, sendo esta instantânea; os grilos submetidos à inoculação apenas do veículo não apresentaram sinais de alteração.

Diante dos resultados negativos obtidos no ensaio biológico de atividade inseticida, optou-se por produzir a forma recombinante madura do peptídeo (U2-SCTX-Li1b), ou seja, sem a sequência anterior do propeptídeo, preservando-se os codons otimizados. O fragmento correspondente à sequência madura foi amplificado com a utilização de *primers* específicos, resultando na obtenção de um produto de PCR com, aproximadamente, 190 pb. O fragmento foi então gel-extraído e a clonagem em vetor pPICZαC foi realizada como reportado anteriormente, resultando na obtenção de 2 clones positivos (figura 24). A



análise do sequenciamento revelou que a sequência clonada preservou a fase de leitura (ORF) correta do peptídeo com as demais sequências do vetor (fator de secreção  $\alpha$ , epítopo c-Myc e cauda de poli-histidina).

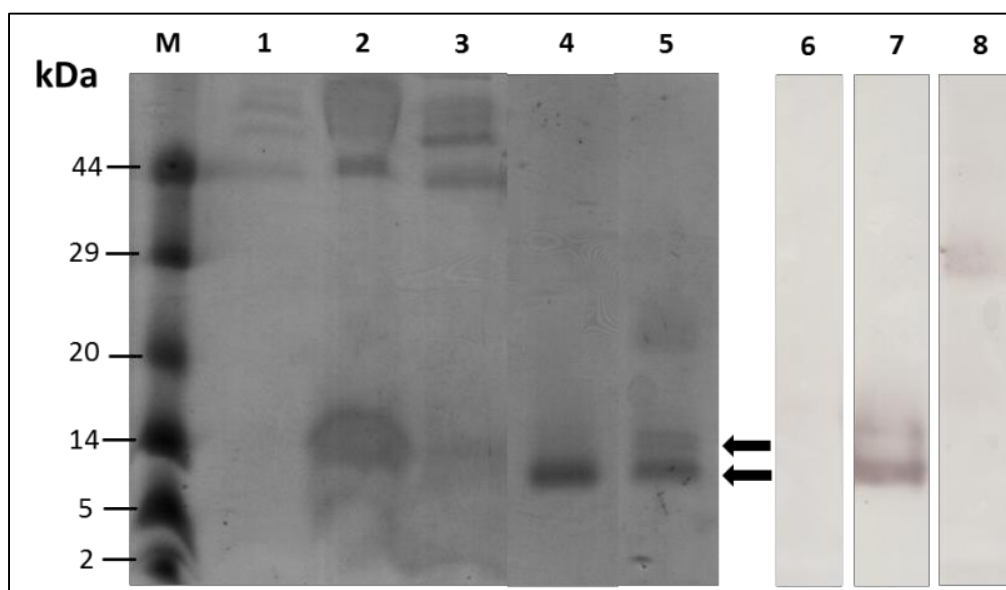


**FIGURA 24: ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO PCR DE COLÔNIA REFERENTE AO PEPTÍDEO MADURO U2-SCTX-Li1b (gel de agarose 1,5%).** Gel representativo de 5 clones testados. Os clones positivos demonstraram banda na altura aproximada de 450pb, sendo 180 relativos ao inserto e 270 referentes às porções do vetor amplificadas.

A construção pPICZ $\alpha$ C/peptídeo U2-SCTX-Li1b maduro foi linearizada com a enzima de restrição SacI e então transformada em cepa de *P. pastoris* X-33. Um dos clones positivos selecionados a partir de placa contendo 100 ug/ml de zeocina foi submetido a expressão em larga escala pelo método convencional (1000 ml de meio de expressão BMMY) de acordo com os seguintes parâmetros: temperatura de expressão de 15°C e 0,5% de indutor, o qual foi adicionado à cultura a cada 24 horas, durante 4 dias consecutivos. Após a expressão, a fração do sobrenadante da cultura foi precipitada com sulfato de amônio e dialisada contra tampão de ligação à resina.

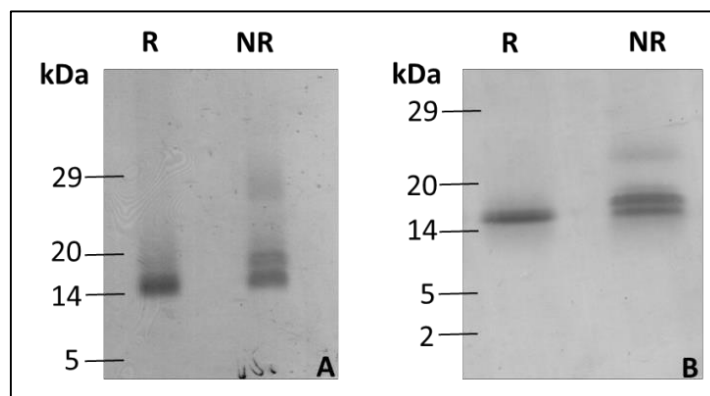
A purificação resultou na obtenção de 1,6 mg de peptídeo por litro de cultura. O peptídeo foi obtido predominantemente em sua forma monomérica, entretanto, tanto no gel de poliacrilamida corado pelo corante azul brilhante de Coomassie, quanto em análise de *western blotting* utilizando anticorpo anti-histag, verificou-se a presença de uma segunda banda ligeiramente acima em relação a banda correspondente ao monômero do peptídeo. Essa banda sugere a ocorrência de uma forma com pontes dissulfeto incorretamente estabelecidas, ou seja, incorretamente dobrada (figura 25).

Por meio de *western blotting* também foi avaliado se toda a massa de peptídeo produzida pela cultura estava sendo secretada ou se parte da produção estaria sendo retida dentro das células de levedura, o que seria responsável pelo baixo rendimento da expressão. Para isso, uma alíquota do *pellet* foi testada com anticorpo anti-histag (figura 25). A não marcação por meio do *western blotting* revelou que a secreção do peptídeo recombinante produzido foi eficiente sob as condições de expressão empregadas.



**FIGURA 25: ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DA PURIFICAÇÃO DO PEPTÍDEO RECOMBINANTE MADURO POR MEIO DE SDS-PAGE (M – 5) E WESTERN BLOTTING (6 – 8).** Em (M) está representado o marcador de massa molecular. Em (1), verifica-se o sobrenadante da cultura antes da indução por metanol. Em (2), o sobrenadante da cultura após os 4 dias de indução por metanol. Em (3), o *void* da cromatografia de afinidade após incubação do sobrenadante com resina de Ni-NTA agarose. Em (4), o peptídeo recombinante purificado sob condições redutoras (5% de  $\beta$ -mercapetanol) e em (5), sob condições não-redutoras. Em (6), o *pellet* da cultura de *P. pastoris*, em (7) o peptídeo recombinante purificado sob condições redutoras (5% de  $\beta$ -mercapetanol) e em (8) sob condições não redutoras, todos incubados com anticorpo primário anti-histag. O padrão de marcação não esperado para o peptídeo recombinante purificado submetido a condições não-redutoras (8) sugere que o epítipo correspondente à cauda de poli-histidina possa estar sendo oculto e por isso a marcação não é visualizada.

Como o peptídeo obtido a partir da expressão em cepa de *P. pastoris* X-33 evidenciou dobramento inadequado, optou-se pela expressão em outras duas cepas de *P. pastoris*, denominadas GS115 e KM71H. A cepa GS115 é muito semelhante à cepa X-33, exceto pelo fato de que a primeira porta uma mutação no gene da enzima histidinol desidrogenase, resultando na incapacidade de sintetizar o aminoácido histidina. Já a cepa KM71H é deficiente em um dos genes AOX (AOX 1) que codifica a enzima responsável pela metabolização do metanol. Isso significa que essa cepa apresenta uma reduzida taxa de consumo de metanol, implicando em uma produção mais lenta da proteína recombinante. Em ambas as cepas, o peptídeo não foi expresso em somente uma forma. Análises por meio de SDS-PAGE (figura 26) e *western blotting* (dado não mostrado) revelaram mais de uma banda nas amostras do peptídeo purificado. A mesma banda em posição ligeiramente superior à forma monomérica do peptídeo observada na expressão do peptídeo maduro em cepa de *P. pastoris* X-33 foi observada quando o peptídeo foi expresso nas cepas GS115 e KM71H, sugerindo um *folding* incorreto das pontes dissulfeto do peptídeo produzido.



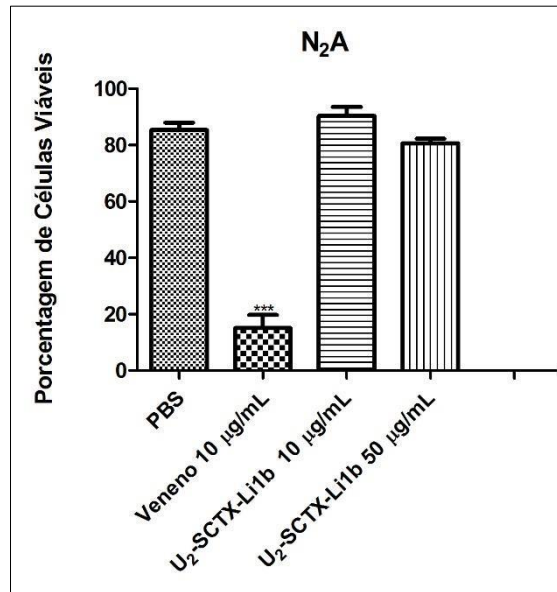
**FIGURA 26: ANÁLISE POR MEIO DE SDS-PAGE DO PEPTÍDEO RECOMBINANTE MADURO PURIFICADO EXPRESSO EM CEPAS DE *P. pastoris* GS115 E KM71H.** Em (A) está representado o peptídeo recombinante purificado expresso em GS115. Em (B) está representado o peptídeo recombinante purificado expresso em KM71H. (R) indica amostra sob condições redutoras (%5 de  $\beta$ -mercapetanol) e sob condições não-redutoras.

A expressão em larga escala (1 litro de cultura) na cepa KM71H resultou na purificação de 900  $\mu$ g de peptídeo recombinante (rendimento de 0,9 mg/L de

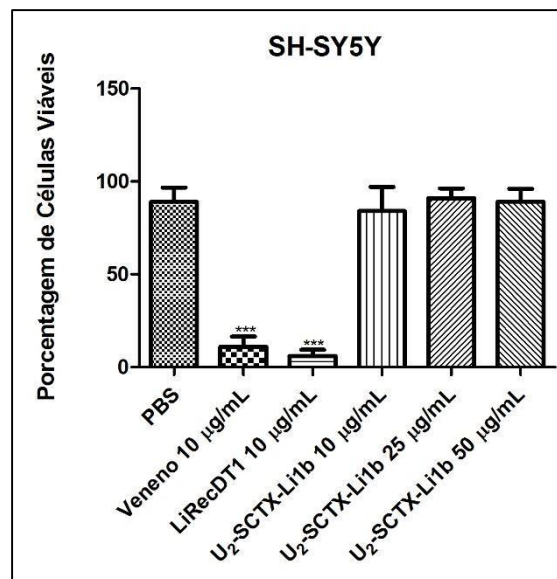
meio BMMY). A expressão em GS115 foi realizada em menor escala (200 ml) e resultou na purificação de 175 µg do peptídeo maduro recombinante (rendimento de, aproximadamente, 0,88 mg/L de meio BMMY).

As amostras purificadas do peptídeo U2-SCTX-Li1b obtidas a partir da expressão nas 3 cepas relatadas (X-33, GS115 e KM71H) foram utilizadas em ensaio biológico para verificar a atividade inseticida em grilos, em larvas de coleópteros (tenébrios) e em larvas da laranja. Cinco espécimes de cada inseto foram utilizados para cada tratamento. Para os grilos, o peptídeo U2-SCTX-Li1b foi testado de acordo com as seguintes massas injetadas: 10 µg, 50 µg e 100 µg por espécime; para os tenébrios, as massas do peptídeo U2-SCTX-Li1b utilizadas foram: 5 µg, 15 µg e 30 µg por espécime. Para as larvas da laranja foram utilizadas 5 µg, 20 µg e 50 µg de peptídeo recombinante por espécime. Como controle positivo foi utilizado veneno bruto de *L. intermedia* (1 µg) e como controle negativo foi utilizado o veículo (PBS). Nenhum efeito de paralise ou letalidade foi evidenciada mesmo após 72 h pós-injeção do peptídeo U2-SCTX-Li1b para todos os espécimes analisados. Os insetos inoculados com veneno bruto de *L. intermedia* apresentaram 100% de morte instantânea em todos os testes, bem como os animais submetidos à injeção pelo veículo não apresentaram sinais que pudessem ser associados a efeitos tóxicos.

O peptídeo U2-SCTX-Li1b expresso na cepa X-33 também foi testado em ensaios *in vitro* em cultura de células, utilizando as linhagens N2A e SH-SY5Y, para verificar a viabilidade das células após 24 horas de tratamento pelo método de exclusão por azul de Trypan. Neste experimento o controle positivo foi realizado com veneno total de *L. intermedia* (10 µg/ml) e/ou com a toxina recombinante LiRecDT1 (isoforma 1 recombinante de fosfolipase-D do veneno de *L. intermedia*) (10 µg/ml), enquanto que o controle negativo foi realizado com PBS e meio. Para a linhagem N2A foram testadas duas concentrações do peptídeo (10 µg/ml e 50 µg/ml) (figura 27) e para a linhagem SH-SY5Y foram testadas 3 concentrações (10 µg/ml, 25 µg/ml e 50 µg/ml) (figura 28). Nenhuma das concentrações do peptídeo U2-SCTX-Li1b testadas revelaram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) em relação ao controle negativo.

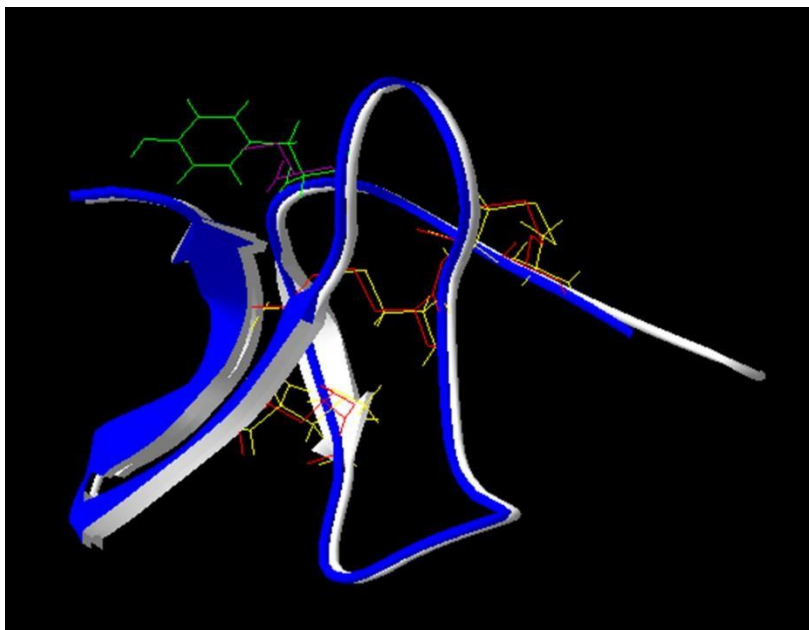


**Figura 27: Avaliação da viabilidade celular por Azul de Trypan após tratamento com o peptídeo recombinante em sua forma madura (U2-SCTX-Li1b) na linhagem celular N<sub>2</sub>A de neuroblastoma murino.** Experimento único, n=3 (\*\*p<0,0001). O controle negativo foi realizado na presença de meio de cultura e PBS; veneno total de *L. intermedia* foi utilizado como controle positivo; as concentrações testadas do peptídeo foram de 10 e 50 µg/ml.



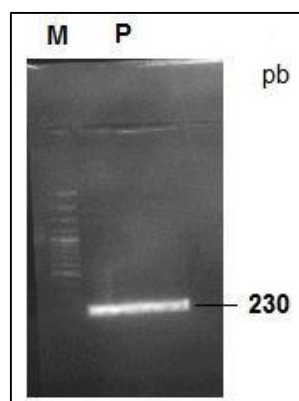
**Figura 28: Avaliação da viabilidade celular por Azul de Trypan após tratamento com o peptídeo recombinante em sua forma madura (U2-SCTX-Li1b) na linhagem celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano.** Experimento único, n=3 (\*\*p<0,0001). O controle negativo foi realizado na presença de meio de cultura e PBS; veneno total de *L. intermedia* e uma fosfolipase-D recombinante (LiRecDT1) foram utilizados como controles positivos; as concentrações testadas do peptídeo foram de 10, 25 e 50 µg/ml.

Os resultados descritos até aqui mostraram que o peptídeo recombinante U2-SCTX-Li1b expresso em *P. pastoris* em análise não revelou atividade inseticida e/ou citotóxica em ensaios *in vivo* (microinjeção em grilos, tenébrios e larvas da laranja) e *in vitro* (ensaios de citotoxicidade em células em cultura). Para avaliar detalhes estruturais que revelassem os motivos pelas quais a atividade biológica do peptídeo pode não ter sido comprovada, foi realizada uma comparação entre as estruturas dos peptídeos U2-SCTX-Li1b (MATSUBARA *et al.*, 2013) e LiTx3 (DE CASTRO *et al.*, 2004) por meio de uma modelagem molecular (Figura 29). A comparação dos peptídeos indicou uma importante diferença estrutural: em uma região de alça do peptídeo U2-SCTX-Li1b foi observada a presença de um aminoácido com cadeia lateral polar não-carregada (resíduo de serina), enquanto que nessa mesma posição na estrutura primária do peptídeo LiTx3, observou-se a presença de um aminoácido de cadeia lateral aromática (resíduo de tirosina). Além disso, análises das sequências das prováveis isoformas do peptídeo LiTx3, identificadas por meio do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* (GREMSKI *et al.*, 2010), revelaram que muitas delas apresentavam o resíduo de tirosina em posição equivalente. Dessa forma, optou-se por produzir uma forma mutada do peptídeo U2-SCTX-Li1b, denominado como U<sub>2</sub>-SCTX-S5Y, contendo o resíduo de tirosina na posição originalmente ocupada pelo resíduo de serina (Ser) (Figura 29).



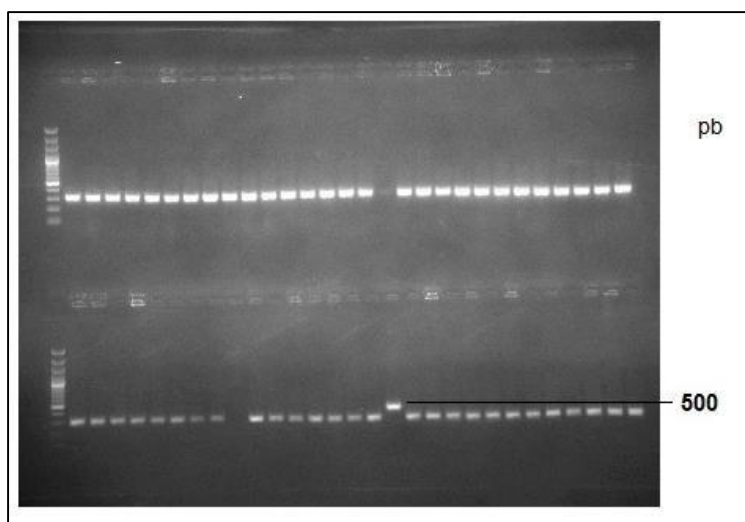
**FIGURA 29: Predição estrutural entre os peptídeos U2-SCTX-Li1b e LiTx3.** Em cinza está representado o peptídeo U2-SCTX-Li1b com suas respectivas pontes dissulfeto destacadas em vermelho. Em azul está representado o peptídeo LiTx3 com suas respectivas pontes dissulfeto destacadas em amarelo. O resíduo de tirosina presente no peptídeo LiTx3 encontra-se marcado em verde, enquanto que o resíduo de serina presente no peptídeo U2-SCTX-Li1b está destacado na cor roxa.

A sequência referente ao peptídeo U2-SCTX-S5Y foi amplificada *in vitro* por meio de PCR e como molde utilizou-se uma construção codificante do peptídeo U2-SCTX-Li1b clonada no vetor de expressão pPICZαC previamente obtida. Essa amplificação foi realizada com a utilização de primers específicos para a sequência em questão contendo sítios de restrição para as enzimas *ClaI* e *XbaI*. O resultado, visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose, mostrou, como esperado, um produto amplificado contendo, aproximadamente, 230 pb (Figura 30).



**FIGURA 30: Análise eletroforética do produto de amplificação da sequência do peptídeo U2-SCTX-S5Y em gel de agarose 1,5%.** Foi observada uma banda específica correspondente a altura aproximada de 230pb. (M) representa o marcador de massa molecular e (P) o produto amplificado.

Após a gel-extração do produto amplificado, procedeu-se a digestão com as enzimas *Clal* e *XbaI* e a posterior ligação do produto digerido no vetor pPICZα C. A construção obtida foi então transformada na cepa de clonagem *E. coli* TOP10F' e um clone recombinante positivo foi confirmado através de um PCR de colônia realizado a partir das bactérias crescidas na placa resultante da transformação, como pode ser visualizado na figura 31.

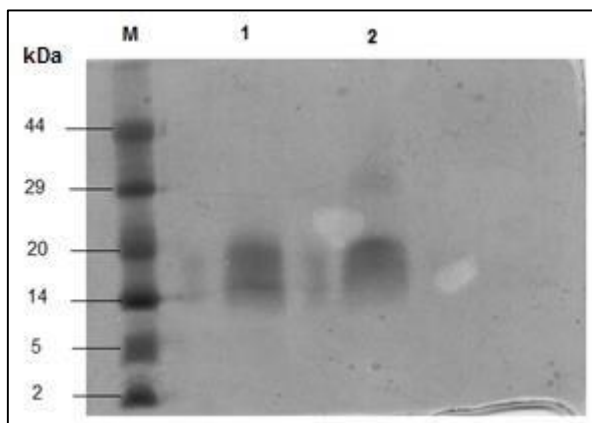


**FIGURA 31: Análise do perfil eletroforético do PCR de colônia referente ao peptídeo U2-SCTX-S5Y em gel de agarose 1,5%.** Gel representativo de 58 clones testados, sendo o único clone positivo referente a banda presente na altura aproximada de 450pb, sendo 230pb relativos ao inserto e 270pb correspondentes às porções do vetor amplificadas.



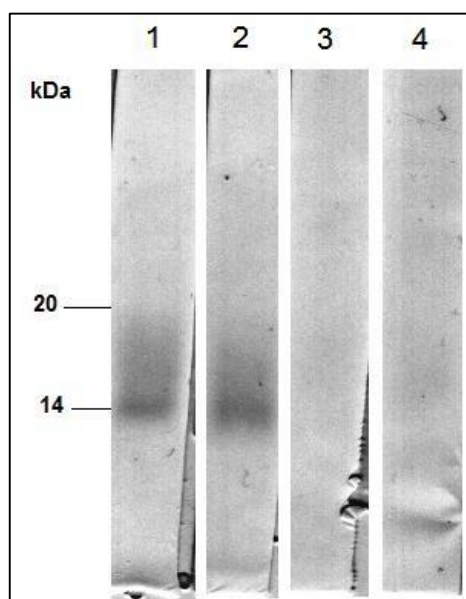
A partir do clone positivo foi realizada uma minipreparação para extração do plasmídeo e, em seguida, procedeu-se o sequenciamento, o qual revelou a integridade da sequência clonada, bem como a correta fase de leitura da mesma. Uma alíquota de 10 ug da construção isolada foi submetida à linearização com a enzima *SacI* e transformada em cepa de levedura *Pichia pastoris* X-33 por meio do kit *Pichia EasyComp*<sup>TM</sup> de acordo com as recomendações do fabricante. Os clones positivos de *P. pastoris* foram selecionados pelo antibiótico zeocina (100 ug/ml).

Posteriormente, um clone positivo isolado foi submetido ao processo de expressão na cepa X-33 de *P. pastoris*, seguido de purificação e dosagem do peptídeo U2-SCTX-S5Y obtido, de acordo com a metodologia anteriormente descrita. O procedimento relatado foi realizado duas vezes e os rendimentos foram de 4,5 mg/L e 5,7 mg/L de peptídeo U2-SCTX-S5Y. Amostras de 5 ug do peptídeo recombinante obtido foram submetidas à análise em SDS-PAGE 18%, sob condições redutoras (presença do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol) e não-redutoras (ausência do referido agente redutor) (Figura 32). A banda correspondente ao peptídeo em estudo, verificada por meio de SDS-PAGE, apresentou aspecto difuso, com massa molecular entre 14k Da e 20 kDa.



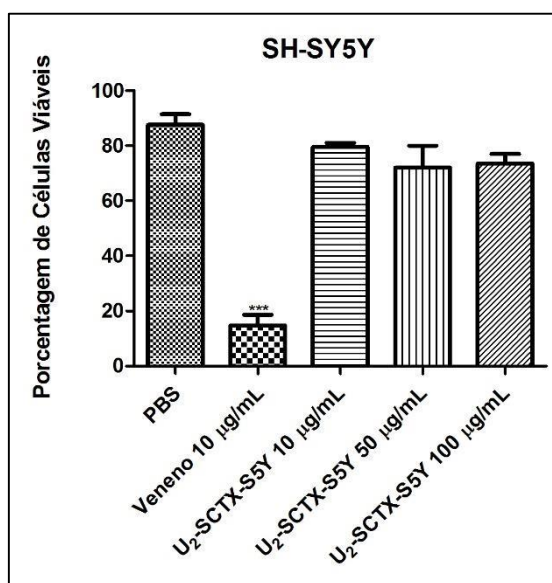
**FIGURA 32: Análise por meio de SDS-PAGE 18% da expressão e da purificação do peptídeo U2-SCTX-S5Y expresso em *Pichia pastoris* X33. Em (M) está representado o marcador de massa molecular, em 1 está representada a amostra contendo o peptídeo na forma reduzida e em 2, a amostra contendo o peptídeo na forma não-reduzida.**

O peptídeo U2-SCTX-S5Y recombinante também foi analisado por *Western Blotting* com a utilização dos anticorpos primários anti-*histag* e anti-Myc, em condições redutoras e não-redutoras. Como mostra a figura 33, ambos os anticorpos permitiram a visualização, mesmo em condições redutoras, de bandas difusas correspondentes ao peptídeo U2-SCTX-S5Y em questão. Esse perfil de bandas difusas poderia ser atribuído à glicosilação/hiperglicosilação do peptídeo recombinante, modificação essa que poderia interferir no estabelecimento da correta conformação do mesmo, em especial, o estabelecimento das pontes dissulfeto. Sob condições não-redutoras, os dois anticorpos testados não permitiram a visualização de bandas. Esse resultado sugere o dobramento incorreto do peptídeo expresso, resultando no comprometimento da exposição dos epítomos de reconhecimento (epítomos c- Myc e *histag*) para a interação com os anticorpos específicos.



**FIGURA 33: Análise por meio de *Western Blotting* (utilizando os anticorpos anti-*histag* e anti- Myc) do peptídeo U2-SCTX-S5Y purificado expresso em *Pichia pastoris* X33.** Foi observada marcação específica nas alturas aproximadas de 14 kDa a 20 kDa nas amostras reduzidas. (1) representa o peptídeo U2-SCTX-S5Y sob condições redutoras e imunodetectado pelo anticorpo anti-*histag*; (2) representa o peptídeo U2-SCTX-S5Y sob condições redutoras e imunodetectado pelo anticorpo anti-Myc; (3) corresponde ao peptídeo U2-SCTX-S5Y sob condições não-redutoras e imunodetectado pelo anticorpo anti-*histag*; (4) representa o peptídeo U2-SCTX-S5Y sob condições não-redutoras e imunodetectado pelo anticorpo anti-Myc.

Ensaio biológico com o peptídeo U2-SCTX-S5Y obtido foram realizados por meio de microinjeção em grilos (*Gryllus* sp). Diferentes massas do peptídeo recombinante foram testadas (5 ug, 15 ug, 30 ug e 75 ug), entretanto, nenhum efeito tóxico foi observado nesses insetos mesmo após 72 horas de tratamento. Um ensaio de viabilidade celular após tratamento com o peptídeo também foi realizado em células da linhagem SH-SY5Y. Novamente, em nenhuma das concentrações testadas (10, 50 e 100 ug/ml) foi verificada atividade do peptídeo em questão (figura 34).



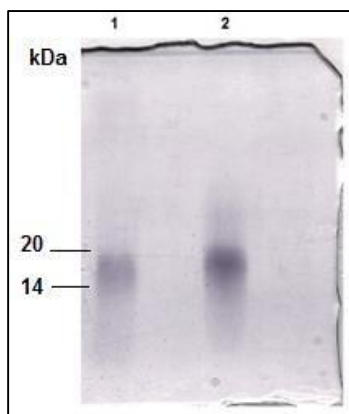
**Figura 34: Avaliação da viabilidade celular por Azul de Trypan após tratamento com o peptídeo recombinante mutado (U2-SCTX-S5Y) na linhagem celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano.** Experimento único, n=3 (\*\*p<0,0001). O controle negativo foi realizado na presença de meio de cultura e PBS; veneno total de *L. intermedia* foi utilizado como controle positivo; as concentrações testadas do peptídeo U2-SCTX-S5Y foram de 10, 50 e 100 µg/ml.

Diante dos dados relatados acima (perfil difuso do peptídeo em SDS-PAGE, imunodeteções negativas do peptídeo sob condições não-redutoras visualizadas por *Western Blotting* e ausência de atividade biológica em insetos e em células em cultura), os quais sugerem o dobramento incorreto do peptídeo durante a sua produção em *Pichia pastoris*, optou-se por produzir uma nova forma do peptídeo U2-SCTX-S5Y. Dessa maneira, a sequência do peptídeo U2-SCTX-S5Y foi alterada retirando-se o epítipo c-Myc e alterando a posição da

cauda de histidina da posição C-terminal para a posição N-terminal. Tais medidas foram implementadas com o objetivo de obter o peptídeo livre de glicosilação e, assim, com o dobramento correto. A cauda de histidina foi mantida, pois ela é necessária para os procedimentos de purificação e imunodeteção, além de auxiliar na solubilidade do peptídeo recombinante produzido. O cDNA codificante dessa nova forma do peptídeo U2-SCTX-S5Y foi sintetizado pela empresa GenScript e então nomeado de U2-SCTX-N-his.

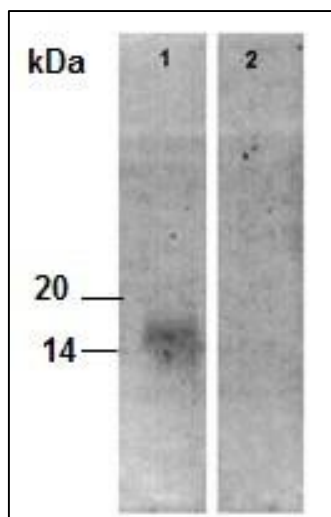
A sequência codificante do peptídeo U2-SCTX-N-his, com 190pb foi adquirida em vetor pPICZαC e para a confirmação da correta fase de leitura e ausência de mutações, realizou-se um sequenciamento como descrito para a sequência do peptídeo U2-SCTX-S5Y. Em seguida, uma alíquota de 10 ug da construção isolada foi linearizada com a enzima *SacI* e transformada na cepa de *Pichia pastoris* X-33. Os clones positivos de *P. pastoris* foram selecionados pelo antibiótico zeocina (100 ug/ml).

O processo de expressão ocorreu como descrito para o peptídeo U2-SCTX-S5Y. Um clone positivo isolado foi submetido ao processo de expressão para a obtenção do peptídeo U2-SCTX-N-his. O produto resultante da expressão foi purificado e quantificado pelo método de Bradford, como descrito na metodologia. O rendimento da expressão foi de 1,2 mg do peptídeo recombinante por litro de meio BMMY. Amostras de 5 ug foram analisadas por meio de SDS-PAGE 18% sob condições redutoras e não-redutoras (Figura 36). O resultado da eletroforese mostrou que realmente houve expressão do peptídeo, porém este se apresentou com o mesmo perfil de banda difusa do peptídeo U2-SCTX-S5Y anteriormente obtido.



**FIGURA 36: Análise por meio de SDS-PAGE 18% da expressão e da purificação do peptídeo U2-SCTX-N-his expresso em *Pichia pastoris* X33.** Foram visualizadas bandas específicas nas alturas aproximadas de 14 Kda e 20 kDa em ambas as amostras. Em 1 está representada a amostra na forma reduzida e em 2 a amostra na forma não-reduzida.

O peptídeo U2-SCTX-N-his purificado foi analisado por *Western Blotting* utilizando-se o anticorpo anti-*histag* como anticorpo primário, sob condições redutoras e não-redutoras. Como mostra a figura 37, em condições redutoras, foi visualizada a mesma banda de aspecto difuso correspondente ao peptídeo U2-SCTX-S5Y e que aparenta ser característica de glicosilação/hiperglicosilação, modificação pós-traducional indesejada para o peptídeo produzido. Em condição não-redutora, o anticorpo anti-*histag* continuou não permitindo a visualização de bandas, mesmo com a alteração de posição da cauda de histidina. Esses resultados sugerem que as alterações realizadas na sequência do peptídeo U2-SCTX-S5Y não foram suficientes para a obtenção do peptídeo em sua forma adequada.

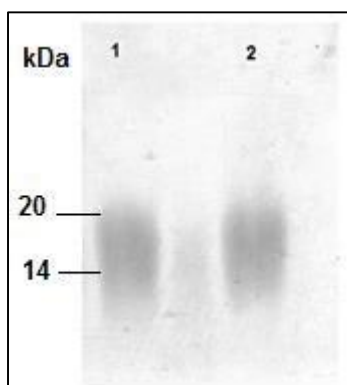


**FIGURA 37. Análise através de *Western Blotting* do peptídeo U2-SCTX-S5Y N-his purificado expresso em *Pichia pastoris* X33.** Foi observada uma marcação específica na altura aproximada de 190pb na amostra reduzida (1). Em (2) está representada a imunodeteção do peptídeo na forma não reduzida; nenhuma marcação foi visualizada.

Ainda na tentativa de melhorar o dobramento do peptídeo U2-SCTX-N-his, optou-se pela expressão na cepa KM71H (Mut<sup>S</sup>) de *Pichia pastoris*, que não apresenta um dos genes AOX1 responsáveis por codificar a enzima que metaboliza o metanol. Desse modo, essa cepa apresenta uma taxa de consumo de metanol reduzida, o que implica em uma síntese mais lenta do peptídeo recombinante. Essa produção mais lenta, por sua vez, poderia aumentar a probabilidade de obtenção do peptídeo U2-SCTX-N-his com sua conformação correta, uma vez que a expressão mais rápida poderia sobrecarregar as organelas responsáveis pela síntese e pela realização de modificações pós-traducionais do peptídeo, causando problemas estruturais no mesmo.

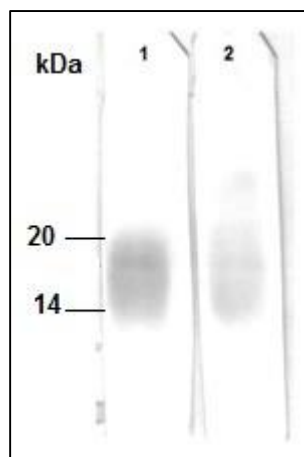
As etapas anteriores à expressão (clonagem e transformação) ocorreram como descrito para o peptídeo U2-SCTX-N-his expresso na cepa X-33 de *Pichia pastoris*. A partir de um clone recombinante positivo para a sequência do peptídeo U2-SCTX-N-his foi preparado um inóculo menor, contendo 10 ml de meio BMGY. Após 16h as células de levedura da cepa KM71H crescidas nesse meio foram transferidas para um pré-inóculo maior contendo 1000 ml de meio BMGY, divididos em 2 erlenmeyers com 500 ml. Depois de 24h, essas células foram colocadas em um inóculo contendo 200 ml de meio BMMY, em que permaneceram por 6 dias expressando o peptídeo à 15°C, com 0,5% de metanol

como indutor adicionado a cada 24 h. A etapa de purificação foi realizada como descrito para o peptídeo expresso em *Pichia pastoris* X33. O rendimento do peptídeo expresso na cepa KM71H foi de 270 µg para 200 ml de meio BMMY. O perfil eletroforético do peptídeo U2-SCTX-N-his expresso em *Pichia pastoris* KM71H não mostrou diferença do perfil apresentado por esse mesmo peptídeo quando expresso em *Pichia pastoris* X33 (figura 38), demonstrando que a possível glicosilação/hiperglicosilação do peptídeo continuou acontecendo.



**FIGURA 38. Análise por meio de SDS-PAGE 18% da expressão e da purificação do peptídeo U2-SCTX-N-his expresso em *Pichia pastoris* KM71H.** Foram visualizadas bandas específicas nas alturas aproximadas de 14 Kda e 20 kDa em ambas as amostras. Em 1 está representada a amostra na forma reduzida e em 2 a amostra na forma não reduzida.

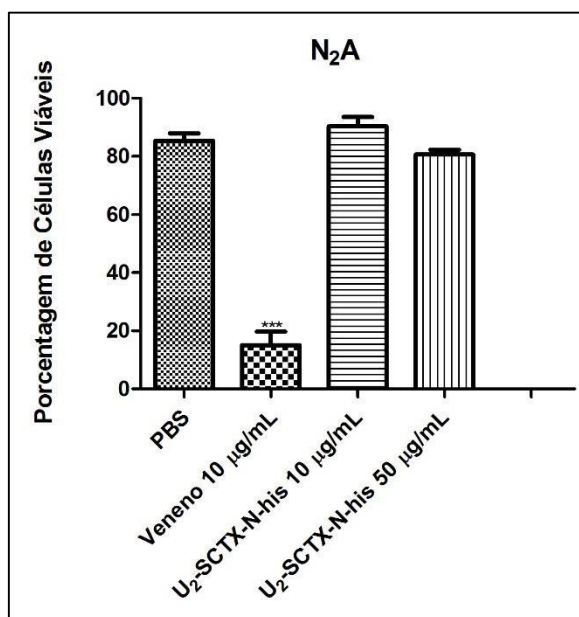
O *Western Blotting* (figura 39) reproduziu a mesma situação encontrada na eletroforese em gel de poliacrilamida. Entretanto, ao contrário dos peptídeos U2-SCTX-S5Y e U2-SCTX-N-his expressos em *Pichia pastoris* X33, o peptídeo U2-SCTX-N-his expresso em *Pichia pastoris* KM71H foi identificado pelo anticorpo anti-*histag* tanto na amostra reduzida quanto na amostra não-reduzida. Este resultado sugere que o peptídeo obtido expresso na cepa Mut<sup>S</sup> KM71H apresentou conformação mais próxima do dobramento nativo, com a cauda de histidina exposta para imunodeteção pelo anticorpo específico.



**FIGURA 39. Análise através de Western Blotting do peptídeo U2-SCTX-N-his purificado expresso em *Pichia pastoris* KM71H.** Foi observada uma marcação específica na altura aproximada de 14 kDa em ambas as amostras. Em 1 está representado o peptídeo identificado pelo anti-his em amostra na forma reduzida e em 2 está representado o peptídeo identificado por esse mesmo anticorpo na forma não-reduzida.

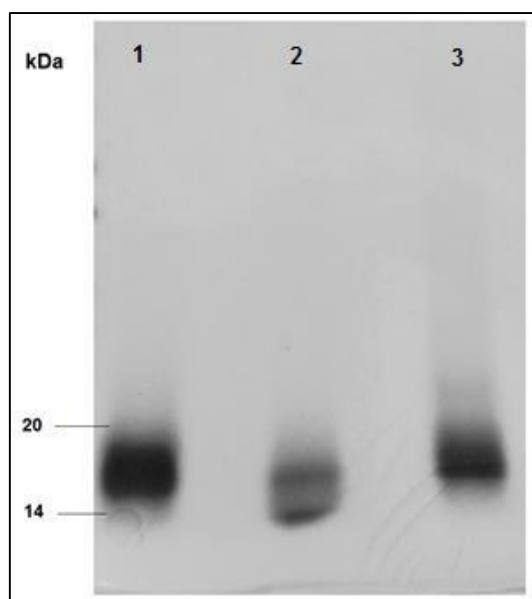
Um teste biológico piloto com o peptídeo U2-SCTX-N-his em grilos foi realizado (5 ug, 35 ug, 50 ug e 70 ug do peptídeo em estudo), entretanto, também não foi observada nenhum efeito tóxico nesses insetos, mesmo após 72 h pós-injeção. Foi realizado também um experimento de viabilidade por azul de Trypan após tratamento de 24 h das células da linhagem N<sub>2</sub>A com a toxina em duas diferentes concentrações (10 e 50 ug/ml), entretanto, nenhuma diferença estatística foi observada (figura 40).





**Figura 40: Avaliação da viabilidade celular por Azul de Trypan após tratamento com o peptídeo recombinante em sua forma madura (U2-SCTX-Li1b) na linhagem celular N2A de neuroblastoma murino.** Experimento único, n=3 (\*\*p<0,0001). O controle negativo foi realizado na presença de meio de cultura e PBS; veneno total de *L. intermedia* foi utilizado como controle positivo; as concentrações testadas do peptídeo foram de 10 e 50 µg/ml.

Para confirmar se o perfil de banda (aspecto difuso) encontrado nos géis de poliacrilamida e nos resultados de *Western Blotting* dos peptídeos corresponderiam à glicosilação/hiperglicosilação, realizou-se um teste de deglicosilação do peptídeo U2-SCTX-S5Y (Figura 41). Os resultados, analisados através de um gel de poliacrilamida, revelaram uma diminuição da massa molecular do peptídeo quando realizado o procedimento de beta-eliminação para retirada de possíveis resíduos de açúcares o-ligados; além disso, o peptídeo teve uma redução no padrão difuso quando analisado por SDS-PAGE (Figura 19). Quando incubado com a enzima n-glicanase, que degrada açúcares n-ligados, não houve mudança na mobilidade eletroforética do peptídeo. Assim, pode-se afirmar que o peptídeo U2-SCTX-S5Y expresso em *Pichia pastoris* é produzido de forma glicosilada/hiperglicosilada (o-glicosilação), o que pode estar resultando no dobramento incorreto do mesmo. O estabelecimento de uma conformação incorreta, por sua vez, pode estar associada à não verificação da atividade biológica esperada.



**FIGURA 41: Análise por meio de SDS-PAGE 15% da deglicosilação do peptídeo U2-SCTX-N-his.** (1) Peptídeo hiperglicosilado. (2) Peptídeo o-deglicosilado. (3) Peptídeo n-deglicosilado.

## 5 DISCUSSÃO

O peptídeo em estudo é caracterizado por conter 10 resíduos de cisteína, os quais estabelecem 5 pontes dissulfeto intramoleculares, e é enquadrado na família dos peptídeos ICK (*Inhibitor Cystine Knot Peptides*), também denominados notinas. O peptídeo pró-U2-SCTX-Li1b foi anteriormente obtido de forma recombinante em cepa de *E. coli* AD494(DE3) (MATSUBARA *et al.*, 2013). Entretanto, o fato de bactérias não apresentarem sistema de endomembranas (retículo endoplasmático e complexo de Golgi) para a correta síntese e dobramento das moléculas nelas expressas, resultou na produção do peptídeo pró-U2-SCTX-Li1b sem atividade biológica nos testes *in vivo* em insetos e *in vitro* em cultura de células realizados. O ambiente redutor do citoplasma bacteriano é um forte impedimento para a correta formação das pontes dissulfeto, impossibilitando o estabelecimento da conformação ideal das moléculas produzidas nesse modelo.

Dessa forma, a alternativa mais assertiva é a expressão do peptídeo em questão em modelos eucarióticos, como células de levedura, células de insetos ou células de mamíferos. A levedura *Pichia pastoris* tem sido extensivamente manipulada para a expressão de proteínas recombinantes, uma vez que, por se tratar de uma célula eucariótica, é capaz de promover as modificações co-traducionais e pós-traducionais necessárias para o *folding* adequado das moléculas estudadas (CREGG *et al.*, 2000). Uma vantagem do modelo de *P. pastoris* é a expressão da proteína fusionada a um fator de secreção para o ambiente externo, tornando facilitado o processo de purificação a partir do sobrenadante do meio de cultura, sem a necessidade de metodologias de lise das células como ocorre nas bactérias.

No presente trabalho, a primeira tentativa de expressão em *P. pastoris* foi da pró-forma do peptídeo U2-SCTX-Li1b (pró-U2-SCTX-Li1b), ou seja, da sequência madura do peptídeo associada ao propeptídeo. Essa estratégia foi utilizada pois na literatura é descrito que o propeptídeo pode auxiliar no estabelecimento do *folding* correto das proteínas, além de conferir maior eficiência à codificação de certas modificações pós-traducionais (WONG *et al.*, 2013; BANDYOPADHYAY *et al.*, 1998). Bruce e colaboradores (2011) reportaram a necessidade da expressão do propeptídeo juntamente com o

peptídeo maduro para a obtenção de um toxina peptídica rica em pontes dissulfeto (conotoxina) de um caramujo marinho (*Conus textile*) na sua forma biologicamente ativa; quando os autores desse trabalho expressaram o peptídeo em *P. pastoris* na sua forma madura (sem o propeptídeo), nenhum traço do peptídeo recombinante foi detectado por análises de *western blotting*, sugerindo a necessidade do propeptídeo tanto para a expressão quanto para a conformação adequada da toxina recombinante. Análises por *western blotting* revelaram que o peptídeo U2-SCTX-Li1b expresso na sua pró-forma (pró-U2-SCTX-Li1b) não foi bem sucedida, pois o peptídeo obtido se encontrava agregado e não em sua forma monomérica. Isso indica que o sistema de endomembranas das leveduras não funcionou de forma adequada, provavelmente falhando no estabelecimento da configuração correta das pontes dissulfeto. Em expressões a partir de culturas de *P. pastoris* conduzidas em biorreatores já foram relatados problemas de agregação das proteínas recombinantes secretadas, ainda mais quando essas contêm pontes dissulfeto intramoleculares (WU *et al.*, 2012; TLEUGABULOVA *et al.*, 1998; WOO *et al.*, 2006).

Além do problema da agregação, o rendimento em massa do peptídeo pró-U2-SCTX-Li1b expresso foi baixo (aproximadamente 550 ug/L de cultura) quando comparado a outros peptídeos ricos em pontes dissulfeto presentes em venenos animais e também expressos em leveduras: o peptídeo neurotóxico HWTX-I da aranha *Selenocosmia huwena* rendeu 80 mg/L de cultura quando expresso em *P. pastoris* (Nie *et al.*, 2002); Anangi e colaboradores (2012) relataram a expressão também em *P. pastoris* de peptídeos ricos em pontes dissulfeto provenientes do veneno de duas espécies de escorpião (peptídeo Agitoxina-2, da espécie *Centruroides margaritatus*, e peptídeo margatoxina, da espécie *Leiurus quinquestriatus hebraeus*) em níveis até 8 vezes mais elevados (de 12 a 18 mg de peptídeo recombinante por litro de cultura) em relação à expressão em bactérias (aproximadamente 2-3 mg/L de cultura); Yang e colaboradores (2009) obtiveram, a partir da expressão em *P. pastoris*, 500 mg do peptídeo analgésico BmK AngM1 do escorpião *Buthus martensii* por litro de cultura; a toxina peptídica denominada GsMTx4 presente no veneno da tarântula *Grammostola spatulata* rendeu cerca de 100 mg por litro de cultura quando expressa em *P. pastoris* (PARK *et al.*, 2008). A fim de suplantar o baixo

rendimento em massa do peptídeo pró-U2-SCTX-Li1b expresso foi realizada a otimização dos códons para *P. pastoris*. Esse procedimento de seleção dos códons preferenciais para *P. pastoris* é importante pois a ocorrência de muitos códons raros pode afetar de forma crucial o processo de tradução de proteína (principalmente se ocorrem em *tandem* ou localizados na região N-terminal da proteína), resultando em baixos níveis de expressão dos produtos recombinantes (GUSTAFSSON *et al.*, 2004; ANGOV, 2011). É sabido que a otimização de códons, em muitos casos, foi capaz de aumentar consideravelmente em uma ou até 10 vezes a expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* sem alterar a biomassa durante a expressão e nem os níveis de RNAm e, por isso, tem sido prática recorrente nos estudos de expressão heteróloga de proteínas nesse organismo (HU *et al.*, 2013). A síntese da sequência otimizada do peptídeo pró-U2-SCTX-Li1b foi realizada pela empresa GENSCRIPT®, de acordo com o algoritmo OptimumGene™. Esse algoritmo leva em consideração um parâmetro definido como “índice de adaptação de códons” (CAI), que é uma medida baseada na correlação entre a preferência de códons de um gene e o seu respectivo nível de expressão. CAI igual a 1 é considerado como sequência perfeita para a expressão no hospedeiro desejado, enquanto que valores de CAI mais próximos de 0 sugerem a obtenção de baixos níveis de expressão na prática; CAI igual ou superior a 8 é desejável para a expressão em níveis razoáveis a altos. A otimização da sequência codificante do peptídeo pró-U2-SCTX-Li1b determinou a elevação do CAI de 0,75 para 0,86 e, na prática, embora o rendimento em massa tenha sido ainda baixo, observou-se um aumento de mais de 61% no nível de expressão desse peptídeo (sequência não-otimizada rendeu 550 ug/L, enquanto que a sequência otimizada rendeu 900 ug/L).

A temperatura durante o tempo de indução da cultura também é um fator importante para a expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* (WU *et al.*, 2012). Esse parâmetro influencia a produção de proteínas recombinantes de forma direta – por, em muitos casos, aumentar a quantidade de proteína sintetizada e secretada – e de forma indireta – regulando a taxa de proteólise. Estudos revelaram que os níveis de expressão de um receptor opióide humano dobraram quando essa molécula era expressa a 15-20°C, em comparação com os níveis apresentados quando a expressão era conduzida a 30°C. Da mesma

forma, a redução da temperatura de indução durante a expressão de 30°C para 23°C rendeu uma massa 10 vezes maior de uma proteína anticongelamento proveniente de um peixe popularmente conhecido como arenque; além disso, quando comparada a taxa de proteólise das culturas após 2 dias nas duas diferentes temperaturas citadas, verificou-se que na cultura a 23°C essa taxa foi menor (DALY; HEARN, 2005). Para o peptídeo pró-U2-SCTX-Li1b otimizado, a redução da temperatura de indução 30°C para 15°C foi importante para a produção do peptídeo na sua forma monomérica, sem a formação do agregado verificado quando a expressão foi realizada na maior temperatura. Assim, pode ser hipotetizado que a redução da temperatura tenha diminuído a sobrecarga da maquinaria envolvida com a síntese de proteína (retículo endoplasmático, principalmente), tornando a produção do peptídeo recombinante mais lenta e facilitando o *folding* correto. Outro fato observado foi que a taxa de crescimento da cultura de *P. pastoris* não foi afetada pela redução da temperatura, uma vez que as DO<sub>600</sub> (absorbâncias a 600 nm) nas duas diferentes expressões não foram significativamente diferentes durante os 4 dias de indução.

Embora as análises por SDS-PAGE tenham sugerido que o peptídeo produzido estava na sua conformação nativa, não foi verificada atividade biológica sobre grilos inoculados com a toxina em questão. Levantou-se a hipótese então de o propeptídeo estar influenciando de forma negativa a conformação e atividade do peptídeo recombinante e, como medida, a sequência otimizada madura do peptídeo foi clonada e expressa de acordo com os mesmos parâmetros já citados (temperatura de indução de 15°C, por 4 dias, em meio BMMY). Nas 3 cepas de *P. pastoris* utilizadas – X-33, GS115 e KM71H

- o peptídeo purificado mostrou-se em pelo menos 2 formas diferentes, indicando que uma dessas formas deriva do estabelecimento incorreto das pontes dissulfeto. É intrigante o fato de peptídeos com pontes dissulfeto incorretas estarem sendo secretados para o meio externo, uma vez que *P. pastoris* conhecidamente possui um controle refinado das proteínas sintetizadas, direcionando as proteínas com *folding* incorreto para a degradação via proteossomo (BROOKS *et al.*, 2005). Wu e colaboradores (2012) especularam que em culturas em rápido crescimento, muitas proteínas associadas com o *folding* possam estar sendo mobilizadas para a síntese de proteínas endógenas necessárias para suportar o crescimento da cultura. Assim, pouca maquinaria

responsável pela síntese e dobramento das proteínas heterólogas, a exemplo das chaperonas, estaria disponível, resultando em muitas proteínas mal formadas que então seriam secretadas para o ambiente externo.

Através de técnicas de modelagem molecular, foram realizadas comparações entre os peptídeos U2-SCTX-Li1b (MATSUBARA *et al.*, 2013) e LiTx3 (de CASTRO *et al.*, 2004) as quais revelaram uma diferença estrutural em uma região de alça. O peptídeo U2-SCTX-Li1b possuía um aminoácido com cadeia lateral polar não carregada (resíduo de serina), enquanto que o peptídeo LiTx3 possuía, nessa mesma posição, um aminoácido de cadeia lateral aromática (resíduo de tirosina). Além disso, analisando a sequência das isoformas da LiTx3 (GREMSKI *et al.*, 2010) verificou-se que muitas delas possuíam esse mesmo resíduo de tirosina.

Devido à grande semelhança estrutural encontrada entre o peptídeo U2-SCTX-Li1b e o peptídeo LiTx3 acredita-se que ambos atuem no mesmo tipo de canal iônico, que de Castro e colaboradores (2004) e Matsubara e colaboradores (2013) demonstraram através de análises de bioinformática, ser o canal de sódio. Além disso, De Castro e colaboradores (2004) comprovaram por ensaios biológicos em larvas de *Spodoptera frugiperda* que o peptídeo LiTx3 apresentava atividade inseticida.

Dessa maneira, adotou-se a estratégia de mutar o peptídeo U2-SCTX-Li1b, colocando-se um resíduo de aminoácido tirosina (aromático) na região originalmente ocupada pelo resíduo de serina (polar não carregado). Assim, a relação estrutura-atividade da LiTx3 seria conservada no peptídeo mutado (denominado como U2-SCTX-S5Y), e o mesmo poderia ser obtido em sua forma ativa. Essa mutação faz com que um resíduo de aminoácido carregado positivamente (lisina) anteceda um resíduo de aminoácido aromático (tirosina). Disposições de aminoácidos como esta podem ser encontradas em diversas neurotoxinas ativas de aranha e, embora a confirmação experimental ainda seja necessária, essa região conservada das neurotoxinas parece estar relacionada com a afinidade das mesmas por canais de sódio (WANG *et al.*, 2000, CORZO *et al.*, 2003, YAMAJI *et al.*, 2009).

A importância de resíduos aromáticos conservados para toxinas também foi confirmada por Sun e colaboradores (2003). Nesse estudo foram realizadas mutações sítio-dirigidas em resíduos aromáticos de uma toxina atuante em

canais de sódio presente no veneno de escorpião *Buthus martensii*. Os ensaios biológicos revelaram que as moléculas mutadas tiveram sua toxicidade drasticamente reduzida. Além disso, nesse estudo foi identificado que as cadeias laterais aromáticas são responsáveis pela estabilização da conformação original da toxina e que elas estão envolvidas na interação com o canal de sódio regulado por voltagem. Desse modo, ficou estabelecido que esses resíduos aromáticos são indispensáveis para a estrutura e atividade dessa toxina (SUN *et al.*, 2003).

Sobre a relação estrutura-função de toxinas, Escoubas e colaboradores revelaram em 2003 que uma toxina de aranha pertencente à classe dos peptídeos ICK interagia com canais *ASICs* (canais iônicos ácido-sensíveis), possivelmente através de regiões de superfície e de resíduos de aminoácidos específicos. Por meio da técnica de ressonância magnética nuclear (*NMR*) e de comparações com outras toxinas foi demonstrado que existem regiões de díades de aminoácidos positivos e aromáticos (lisina/tirosina) conservadas em toxinas, que são importantes para a interação com os canais e para a função da toxina. Posteriormente, em 2014, Rodríguez e colaboradores encontraram essas mesmas díades de (lisina/tirosina e lisina/fenilalanina) em toxinas de anêmona-do-mar que possivelmente interajam com sítios de reconhecimento de receptores *ASICs* e que se assemelham a estruturas funcionais de toxinas que inibem canais de potássio, presentes em anêmonas do mar e escorpiões (ESCOUBAS *et al.*, 2003, RODRIGUÉZ *et al.*, 2014).

Zhang e colaboradores (2003) demonstraram no veneno da aranha do gênero *Selenocosmia huwena* a presença de duas toxinas e que uma delas é a forma naturalmente mutada da outra. Através de ensaios biológicos em insetos detectou-se que os resíduos de aminoácidos mutados eram de grande importância para a atividade da mesma. Esses resíduos englobam um resíduo de serina (polar não carregado) e um resíduo de fenilalanina (aromático) na região C-terminal. Também foi notada grande semelhança entre essas moléculas e outras toxinas de aranha, com os resíduos citados anteriormente presentes de forma conservada nas mesmas.

Dados da literatura também indicam que pequenas diferenças na superfície de peptídeos ICK poderiam explicar variações de afinidade e seletividade da ligação do peptídeo com seu receptor. Essas diferenças na estrutura da superfície do peptídeo dependem da orientação das cadeias laterais



de resíduos aromáticos e/ou distribuição de resíduos carregados e/ou composição dos aminoácidos. Assim, uma pequena variação estrutural promovida por uma mutação poderia influenciar a interação do peptídeo com seu receptor e, assim, influenciar também a sua atividade (WANG *et al.*, 2000, PIMENTEL *et al.*, 2000).

A grande diversidade de peptídeos tóxicos dentro de um mesmo veneno, principalmente encontrada em aranhas e caramujos marinhos, também parece basear-se em diferenças sutis na superfície da estrutura dos peptídeos que podem ser causadas por uma única variação de resíduo de aminoácido. Essas alterações podem provocar não só diferentes interações entre peptídeo e receptor, mas também diferentes seletividades (GREMSKI *et al.*, 2010).

Desse modo, a partir dos estudos citados anteriormente, dentre outros presentes na literatura, pode-se dizer que resíduos específicos de aminoácidos conservados, principalmente os resíduos aromáticos, têm se mostrado essenciais para a relação estrutura-atividade de toxinas e para a seletividade na interação das mesmas com seus respectivos receptores (GREMSKI *et al.*, 2010, CORZO *et al.*, 2003, ESCOUBAS *et al.*, 2003, WANG *et al.*, 2000, YAMAJI *et al.*, 2009, PEIGNEUR *et al.*, 2012, RODRIGUÉZ *et al.*, 2014).

Com a expressão do peptídeo U2-SCTX-S5Y em *Pichia pastoris* X33 foram obtidos aproximadamente 5 mg do peptídeo purificado por litro de expressão. Pode-se considerar este rendimento como razoável considerando resultados anteriores de aproximadamente 1mg/L, obtidos previamente para a U2-SCTX-Li1b expressa em *Pichia pastoris* X33. Entretanto, para obter esse rendimento mais elevado de 5 mg/L foi necessário realizar a expressão em modelo de alta densidade celular, como descrito na metodologia. Dados da literatura mostram rendimentos variáveis para proteínas ricas em pontes dissulfeto presentes em venenos e expressas nesta mesma cepa, desde 2-4 mg/L até 500 mg/L. Desse modo, adaptações das condições de expressão seriam necessárias para o aumento do rendimento do peptídeo U2-SCTX-S5Y (TELANG, *et al.*, 2009, YANG *et al.*, 2009, ANANGI *et al.*, 2010, ANANGI *et al.*, 2012).

As análises das eletroforeses em gel e dos imunoensaaios de *Western Blotting* sugeriram que o peptídeo U2-SCTX-S5Y foi obtido de forma glicosilada, pois o perfil de bandas difusas que o mesmo apresentou condiz com o perfil

eletroforético e as imunodetecções de outras proteínas recombinantes expressas na forma hiperglicosilada (PRATT e GERMINARIO, 1994, OTTERBEIN *et. al.*, 2000, NOURIZAD *et. al.*, 2003, KIM *et al.*, 2007).

A hiperglicosilação mais extensa realizada por leveduras hospedeiras em proteínas recombinantes é a encontrada no *Saccharomyces cerevisiae*, porém ela também pode ocorrer em outras leveduras. *Saccharomyces cerevisiae* geralmente acrescenta de 50 a 150 resíduos de manose nas proteínas, enquanto que a *Pichia pastoris* e a *Hansenula polymorpha* podem acrescentar até 20 resíduos (ÇELIK e ÇALIK, 2012). Há estudos que mostram a obtenção de enzimas e outras proteínas recombinantes hiperglicosiladas em *Pichia pastoris*, desse modo esse evento não é tão incomum (OTTERBEIN *et. al.*, 2000, NOURIZAD *et. al.*, 2003, KIM *et al.*, 2007). Dados da literatura associam resíduos de serina com uma maior prevalência de O-glicosilação em proteínas (CHRISTLET e VELURAJA, 2001, GONZÁLEZ, BRITO e GONZÁLEZ, 2012).

A glicosilação pode influenciar a solubilidade, susceptibilidade a proteólise, a estabilidade térmica, o dobramento, a ligação ao receptor e a atividade *in vivo* da proteína (DIXON, 1991, ÇELIK e ÇALIK, 2012). Assim, pode-se afirmar que a provável glicosilação/hiperglicosilação do peptídeo U2-SCTX-S5Y poderia interferir em sua conformação, alterando sua interação com o canal iônico e sua atividade biológica, o que poderia ter contribuído para a inatividade do peptídeo U2-SCTX-S5Y observada nos ensaios biológicos realizados em grilos e em cultura de células.

Outro indício de que o peptídeo poderia estar com sua conformação alterada se baseia na análise do *Western Blotting* que revelou uma marcação correspondente ao peptídeo apenas na amostra que continha o agente redutor. Assim, é provável que na amostra não reduzida a conformação do peptídeo não esteja permitindo a exposição da cauda de histidina para o seu reconhecimento pelo anticorpo.

A cauda de poli-histidina e o epítopo c-Myc não estarem sendo imunodetectados na forma não reduzida do peptídeo sugere que eles possam estar em uma região interna da molécula, causando perturbações na estrutura tridimensional ideal do peptídeo. Assim a estratégia foi eliminar o epítopo c-Myc e transferir a cauda de poli-histidina da posição C-terminal para a N-terminal, pois isso poderia resultar em uma não interferência desse epítopo na estrutura,

o que poderia ser verificado na forma não reduzida do peptídeo nos imunoensaios.

Entretanto, o novo peptídeo obtido, denominado como U2-SCTX-N-his, apresentou como rendimento apenas 1,2 mg/L de expressão, o que significa uma redução de 76% no rendimento quando comparado com o peptídeo U2-SCTX-S5Y. Considerando que a expressão dos dois peptídeos foi realizada com a mesma cepa (*Pichia pastoris* X33) e nas mesmas condições, é provável que a alteração realizada tenha diminuído a solubilidade do peptídeo U2-SCTX-N-his, resultando em um rendimento menor de peptídeo obtido após purificação.

O perfil em SDS-PAGE e no *Western Blotting* do peptídeo U2-SCTX-N-his expresso em *P. pastoris* X33 se manteve o mesmo do peptídeo U2-SCTX-S5Y expresso na mesma cepa, com bandas de aspecto difuso, demonstrando que a provável glicosilação/hiperglicosilação continuou ocorrendo. Além disso, o imunoensaio continuou sendo positivo apenas para a amostra de peptídeo U2-SCTX-S5Y N-his purificado na forma reduzida, sugerindo que a conformação do peptídeo provavelmente continuou alterada e não permitiu a exposição da cauda de histidina para o reconhecimento específico pelo anticorpo. Assim, a transposição da cauda de *histag* para a extremidade N-terminal do peptídeo U2-SCTX-S5Y parece não ter colaborado de modo significativo para a obtenção da conformação adequada. Essa hipótese condiz com o resultado obtido no ensaio biológico envolvendo grilos que receberam o peptídeo U2-SCTX-N-his, pois não foi observada atividade biológica.

Ainda objetivando uma conformação mais adequada do peptídeo U2-SCTX-N-his, foi realizada a sua expressão em *Pichia pastoris* KM71H, uma cepa Mut<sup>S</sup> que ao consumir menos metanol (indutor de expressão), poderia diminuir a velocidade de expressão do peptídeo, facilitando o *folding* correto do mesmo, pois a tendência de sobrecarga das organelas responsáveis pelas modificações pós-traducionais, que poderia provocar alterações estruturais no peptídeo, seria diminuída. Nesse caso o rendimento obtido foi de 270 µg para 200 ml de meio de expressão, o que corresponde a aproximadamente 1,35 mg/L, muito semelhante ao obtido na expressão desse mesmo peptídeo em *Pichia pastoris* X33. Desse modo, é provável que o baixo rendimento seja fortemente influenciado pela solubilidade diminuída do peptídeo que pode ter sido causada

pela ausência do epítipo c-Myc e não tão influenciado pela diminuição da velocidade de expressão causada pela troca de cepa de expressão.

O resultado da análise eletroforética e do *Western Blotting* demonstrou a mesma banda difusa encontrada para os peptídeos U2-SCTX-S5Y e U2-SCTXN-his expressos em *Pichia pastoris* X33, demonstrando que a provável glicosilação/hiperglicosilação continuava acontecendo. Entretanto, nesse imunoensaio foi verificada uma marcação referente ao peptídeo U2-SCTX-S5Y N-his tanto na amostra reduzida quanto na amostra não reduzida, possivelmente indicando que o dobramento ocorreu de maneira mais adequada, permitindo a exposição da cauda de histidina aos anticorpos específicos.

No entanto, durante a realização do ensaio biológico piloto em que o peptídeo U2-SCTX-N-his foi injetado em grilos não foi possível observar a atividade do mesmo. Assim, pode-se sugerir que o favorecimento do dobramento do peptídeo realizado através da troca da cepa de expressão não foi suficiente para obter o peptídeo U2-SCTX-N-his na sua forma ativa. É possível que a provável glicosilação/hiperglicosilação do mesmo esteja interferindo em sua conformação de modo que as medidas de adequação da estrutura do peptídeo, testadas neste trabalho, não foram suficientes.

Então, para confirmar se a cepa de expressão *Pichia pastoris* estava realmente hiperglicosilando os peptídeos, realizou-se um teste de deglicosilação do peptídeo U2-SCTX-N-his com as enzimas N-glicanase (retira açúcares N-ligados) e reação de  $\beta$ -eliminação (retira açúcares O-ligados). A análise do resultado realizada por meio da eletroforese em gel de acrilamida revelou que não houve N-deglicosilação, porém o peptídeo foi O-deglicosilado, apresentando maior mobilidade eletroforética em relação ao peptídeo original hiperglicosilado, demonstrando que as cepas de expressão *Pichia pastoris* X33 e KM71H promoveram a O-hiperglicosilação do peptídeo, o que veio a confirmar nossa hipótese sugerida pelo aspecto da banda difusa no gel.

Há autores que consideram a expressão em alta densidade, geralmente realizada em *Pichia pastoris*, como prejudicial para as células hospedeiras e para a expressão de proteínas recombinantes. A elevada osmolaridade, alterações de pH, dentre outros fatores são causadores de estresse para a célula hospedeira, podendo causar a diminuição do rendimento da proteína recombinante. Wu e colaboradores (2012) relataram a obtenção de uma proteína

com pontes dissulfeto mal formadas devido a sua expressão em alta densidade, sugerindo que proteínas envolvidas com o *folding* como, por exemplo, chaperonas poderiam estar sendo mobilizadas para a produção de proteínas endógenas necessárias para suportar o rápido crescimento da cultura. Dessa maneira, pouca maquinaria estaria disponível para a realização da síntese e do dobramento de proteínas heterólogas, o que sobrecarregaria esse sistema e causaria erros na conformação dessas proteínas. Esses autores relataram ainda a formação de agregados devido à má formação das proteínas recombinantes.

Assim, a expressão em alta densidade realizada para a obtenção dos peptídeos U2-SCTX-S5Y e U2-SCTX-N-his também poderia estar diminuindo o rendimento dos mesmos, pois peptídeos agregados seriam perdidos no processo de purificação. Além disso, a elevada concentração celular poderia estar contribuindo para a má formação estrutural dos peptídeos.

A partir dos resultados obtidos com a expressão dos peptídeos pode-se afirmar que o dobramento inadequado dos mesmos provavelmente está sendo causado por um conjunto de fatores, entre eles a glicosilação/hiperglicosilação, a sobrecarga de organelas e proteínas responsáveis por modificações pós-traducionais em cepas Mut<sup>+</sup> e a expressão em alta densidade, resultando na produção de peptídeos inativos.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos e as discussões realizadas no presente estudo permitiram concluir que os peptídeos ICK são toxinas presentes em várias aranhas do gênero *Loxosceles*, fornecendo um claro indício de que essas moléculas constituem uma família conservada dentro do gênero.

É possível afirmar também que os peptídeos ICK são produzidos pelas células da glândula de veneno na forma de várias prováveis isoformas, as quais apresentam, na maioria dos casos, similaridade significativa umas com as outras, mas também podem apresentar divergências importantes, a exemplo da presença ou ausência de sítios para modificações pós-traducionais (amidação C-terminal, por exemplo).

A análise comparativa das sequências obtidas suporta a ideia de que os peptídeos rastreados preservam o motivo estrutural “Nó de cistina inibidor” (ICK), indicado pela presença de todos os resíduos de cisteína que compõem este motivo em posição invariável e a conservação das prováveis pontes dissulfeto a serem formadas para o estabelecimento da conformação nativa dos mesmos.

A respeito da obtenção recombinante do peptídeo U2-SCTX-Li1b, podemos concluir que a expressão em modelo eucarioto de *Pichia pastoris* não foi efetivo, uma vez que as várias formas de peptídeo obtidas frequentemente apresentaram-se mal-enoveladas, dando origem a agregação do peptídeo em estudo. Decorre desse resultado a ideia de que a caracterização biológica não pode ser verificada em ensaios in vivo de microinjeção nos insetos e in vitro em cultura de células, pois o não estabelecimento da conformação nativa influenciou de forma negativa a avaliação das atividades das várias formas produzidas do peptídeo.

Os resultados e análises, por fim, sugerem que as aranhas do gênero *Loxosceles* possuem grande diversidade de peptídeos com potencial biotecnológico e/ou terapêutico a serem exploradas. Novos modelos de expressão heteróloga devem ser testados (células de insetos, plantas como o tabaco, etc) a fim de se obter o peptídeo em conformação ideal para a caracterização biológica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. E.; HEROLD, E. E.; VENEMA, V. J. Two classes of channel specific toxins from funnel web spider venom. **J. Comp. Physiol.**, v.164, p.333-342, 1989.

Anangi R, Koshy S, Huq R, Beeton C, Chuang W-J, et al. Recombinant Expression of Margatoxin and Agitoxin-2 in *Pichia pastoris*: An Efficient Method for Production of KV1.3 Channel Blockers. **PLoS ONE**, 2012

ANDRADE, R.M.G.; OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D.; TAMBOURGI, D.V. Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, England, v.37, p.627-632, 1999.

APPEL, M.H.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, G.; VEIGA, S.S. Insights into brown spider and loxoscelism. **Invertebrate survival journal**, Italy, v. 2, p. 52-158, 2005.

APPEL, M.H.; da SILVEIRA R.B.; CHAIM, O.M.; PALUDO, K.S.; SILVA, D.T.; CHAVES, D.M.; da SILVA, P.H.; MANGILI, O.C.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase-D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimica et biophysica acta**, Netherlands, v.1780, p.167-178, 2008.

ARAUJO, S. C., CASTANHEIRA, P., ALVARENGA, L. M., MANGILI, O. C., KALAPOTHAKIS, E. & CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. **Toxicon**, v.41, p.261-267, 2003.

ASHTON, A. C.; RAHMAN, M. A.; VOLYNSKI, K. E.; MANSER, C.; ORLOVA, E. V.; MATSUSHITA, H.; DAVLETOV, B. A.; VAN HEEL, M.; GRISHIN, E. V.; USHKARYOV, Y. A. Tetramerisation of alpha-latrotoxin by divalent cations is responsible for toxin-induced non-vesicular release and contributes to the Ca(2+)-dependent vesicular exocytosis from synaptosomes. **Biochimie**, v.82, p. 453-468, 2003.

ATKINS, J. A.; WINGO, C. W.; SODEMAN, W. A.; FLYNN, J. E. Necrotic arachnidism. **Am J Trop Med Hyg**, v.7, p.165–184, 1958.

BAILEY, P.; WILCE, J. Venom as a source of useful biologically active molecules. **Emergency Medicine**, v.13, p.28-36, 2001.

BALAMURUGAN, V.; REDDY, G. R.; SURYANARAYANA, V. V. S. *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression. System for the production of foreign proteins – vacines. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 175-186, 2007.

BARBARO, K.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Adjuvant effect of *Loxosceles gaucho* (South American brown spider) venom. **Toxicon**, England, v.32, p.687-693, 1994.

BARBARO, K. C.; CARDOSO, L. C.; EICKSTEDT, V. R. D.; MOTA, J. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, v.30, p. 331–338, 1992.

BARBARO, K.C.; JARED, C.; MOTA, I. Aranhas venenosas no Brasil. **Ciência Hoje**, Brazil, v.19, p.48-52, 1995.

BARBARO, KC; FERREIRA, ML; CARDOSO, DF; EICKSTEDT, VRD; MOTA, I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *L. spiders*. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v.29, p.1491-1497, 1996.

BARBARO, K.C.; KNYSACK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, England, v.45, p.489-499, 2005.

BASCUR, L.; YEVENES, I.; BARJA, P. Effects of *Loxosceles laeta* spider venom on blood coagulation. **Toxicon**, v.20, p.795-796, 1982.

BELEBONI, R. O.; PIZZO, A. B.; FONTANA, A. C. K.; CAROLINO, R. O. G.; COUTINHO-NETTO, J.; SANTOS, W.F. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects, **Eur J Pharmacol**, v.493, p.1-17, 2004.

BINFORD, G.J.; WELLS, M.A.. The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogyne spiders. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v.135, p.25-33, 2003.

BOTZKI, A.; RIGDEN, D. J.; BRAUNT, S.; NUKUI, M.; SALMENT, S.; HOECHSTTER, J.; BERNHARDT, G.; DOVE, S.; JEDRZEJAS, M. J.; BUSCHAUER, A. L-ascorbic acid 6-hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor. X-ray structure and molecular modeling of enzyme-inhibitor complexes. **J Biol Chem**, v.279, p.45990-45997, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, United States, v.72, p.248-254, 1976.

BRANTON, W. D.; KOLTON, L.; JAN, Y. N.; JAN, L. Y. Neurotoxins from Plectreurys spider venom are potent presynaptic blockers in *Drosophila*. **J. Neurosci**, v.7, p.4195-4200, 1987.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrates**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc 2003.

BÜCHERL, W.; ROSENFELD, G. Aranhas do genero *Loxosceles* e loxoscelismo na América do Sul. **Memórias do Instituto Butantan**, Brasil, v.30, p.167-186, 1954.

CABRERIZO, S.; DOCAMPO, P.C.; CARI, C.; ROZAS, M.O.; DÍAZ, M.; de ROODT A.; CURCI, O. Loxoscelismo: epidemiología y clínica de una patologia endémica em el país. **Archivos argentinos de pediatría**, Argentina, v.107, p.152-159, 2009.

Catterall, W.A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F.H., Konoki, K., Scheuer, T., 2007. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon** 49, 124-141.

CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; da SILVEIRA, R.B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S.; Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, United States, v.221, p. 64-77, 2006.

CHAIM, O.M.; DA SILVEIRA, R.B.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V.P.; SADE, Y.B.; BÓIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L.H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; TAKAHASHI, H.K.; TOLEDO, M.S.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin:



Endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. *Biochim Biophys Acta*, v. 1811, p. 84–96, 2011.

CHAIM, O. M.; TREVISAN-SILVA, D.; CHAVES-MOREIRA, D.; WILLE, A.C.; FERRER, V.P.; MATSUBARA, F.H.; MANGILI, O.C.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, L.H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes. *Toxins*, v. 3, n. 3, p. 309–44, 2011a.

CHAO, K. L.; MUTHUKUMAR, L.; HERZBERG, O. Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis. **Biochemistry**, v.46, p.6911–6920, 2007.

CHAVES-MOREIRA, D.; CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; PALUDO, K. S.; GREMSKI, L. H.; DONATTI, L.; DE MOURA, J.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DA SILVEIRA, R. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Identification of a direct hemolytic effect 118 dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. *J Cell Biochem*, v. 107, n. 4, p. 655-66.2009.

CHEN, H.S.; TSAI, H.Y.; WANG, Y.M.; TSAI, I.H. P-III hemorrhagic metalloproteinases from Russell's viper venom: cloning, characterization, phylogenetic and functional site analyses, **Biochimie**, France, v.90, p.1486 1498, 2008.

Chen P, Li X, Sun Y, Liu Z, Cao R, He Q, et al. Proteomic analysis of rat hippocampal plasma membrane: characterization of potential neuronal-specific plasma membrane proteins. *J Neurochem* 2006;98:1126–40.

CHOMEZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques**, England, v.15, p.532-534, 1993.

CODDINGTON, J. A.; LEVI, H. W. Systematic and evolution of spiders (Araneae). **Ann.Rev.Ecol.Syst.**, v.22, p.565-592, 1991.

CORZO, G.; ESCOUBAS, P.; STANKIEWICZ, M.; PELHATE, M.; KRISTENSEN, C. P.; NAKAJIMA, T. Isolation, synthesis and pharmacological characterization of d-palutoxins IT, novel insecticidal toxins from the spider *Paracoelotes luctuosus* (Amaurobiidae). **Eur. J. Biochem.**, v.267, p.5783-5795, 2000.

CORZO, G.; ESCOUBAS, P. Pharmacologically active spider peptide toxins. *Cell Mol Life Sci*, v. 60, n. 11, p. 2409-26, Nov 2003.

CORZO, G.; GILLES, N.; SATAKE, H.; VILLEGAS, E.; DAI, L.; NAKAJIMA, T.; HAUPT, J. Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider *Macrothele gigas* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel. *FEBS Letters*, v. 547, n. 1-3, p. 43-50, 2003.

COUTINHO, N. L. R. **Avaliação funcional e histopatológica das alterações renais induzidas pelo veneno da “aranha marrom”, *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934).** In *Biologia Celular*, Mestrado. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 1996.

CRAIK, D. J.; DALY, N. L.; WAINE, C. The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. **Toxicon**, v.39, p.43-60, 2001.

CRAIK, D.; MYLNE, J.; DALY, N. Cyclotides: macrocyclic peptides with applications in drug design and agriculture. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 67, n. 1, p. 9-16, 2010. ISSN 1420-682X.

CRAIK, D. J.; DALY, N. L.; BOND, T.; WAINE, C. Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *Journal of Molecular Biology*, v. 294, n. 5, p. 1327-1336, 1999. ISSN 0022-2836.

da SILVA, P.H.; SILVEIRA, R.B.; APPEL, M.H.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, England, v. 44, p. 693-709, 2004.

da SILVEIRA, R.B.; FILHO J.F.S.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon**, England, v.40, p.815-822, 2002.

da SILVEIRA, R.B.; ROMINE, B.P.; CHAIM, O.M.; APPEL, M.H.; DREYFUSS, J.L.; TOMA, L.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.C.; VEIGA, S.S. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of demonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland. **Biochimie**, France, v.88, p.1241-1253, 2006.

da SILVEIRA, R.B.; CHAIM, O.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-b-N-acetyl-D-hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, England, v.49, p.758-768, 2007c.

da SILVEIRA, R.B.; ROMINE, B.P. CHAIM, O.M.; APPEL, M.H.; SILVA, D.T.; DREYFUSS, J.L. TORNA, L.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: From cloning to functional characterization. **Biochimie**, France, v.59, p.289-300, 2007a.

da SILVEIRA, R. B.; WILLE, A. C. M.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; SILVA, D. T.; FRANCO, C. R. C.; TOMA, L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom. **Biochemical Journal**, England, v.406, p.355-363, 2007b.

de CASTRO, S.C.; SILVESTRE, F.G.; ARAÚJO, S.C.; YAZBEC, G.M.; MANGILI, O. C.; CRUZ, I.; CHAVES-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, I. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*, **Toxicon**, England, v.44, p.273-280, 2004.

de LIMA, M. E.; FIGUEIREDO, S. G.; PIMENTA, A. M. C.; SANTOS, D. M.; BORGES M. H.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; OLIVEIRA, L. C.; STANKIEWICZ, M.; PELHATE, M. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.146, p. 264–279, 2007.

DE OLIVEIRA, C. DE; GONC, R. M.; FERREIRA, J. M. C.; BERG, C. W. VAN DEN; TAMBOURGI, D. V. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. *Toxicon*, v. 45, p. 421–429, 2005.

DENNY, W.F.; DILLAHA, C.J.; MORGAN, P.N. Hemotoxic effect of *L. reclusa* venom: *in vivo* and *in vitro* studies. **J. Lab.Clin. Med.**, v.64, p.291, 1964.

DINIZ, M.R.V.; THEAKSTON, D.G.; CRAMPTON, J.M.; CORDEIRO, M. N.; PIMENTA, A.M.C.; de LIMA, M. E.; DINIZ, C.R. Functional expression and purification of recombinant Tx1, a sodium channel blocker neurotoxin from the venom of the Brazilian “armed” spider, *Phoneutria nigriventer*, **Protein Expression and Purification**, v.50, p.18-24, 2006.

dos SANTOS, V.L.; FRANCO, C.R.; VIGGIANO, R.L.; da SILVEIRA, R.B.; CANTÃO, M.P.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). **Toxicon**, England, v.38, p. 265-285, 2000.

ESCOUBAS, P. Molecular diversification in spider venoms: A web of combinatorial peptide libraries. **Molecular Diversity**, v.10, p.545-554, 2006.

Escoubas, P., Sollod, B., King, G.F., 2006. Venom landscapes: mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. **Toxicon** 47, 650–663.

ESCOUBAS, P.; DIOCHORT, S. CORZO, G. Structure and pharmacology of venom neurotoxins. **Biochimie**, France, v.82, p.893-907, 2000.

ESCOUBAS, P; QUINTON, L.; NICHOLSON, G. M. Venomics: unraveling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.43, p.279-295, 2008.

ESTRADA, G.; VILLEGAS, E; CORZO, G. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. **Natural Product Reports**, v.24; p.145–161, 2007.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.Q.B.; GRANER, E.; MANGILI, O.C.; BRENTANI, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, England, v.36, p.1039- 1051,1998.

FERNANDES-PEDROSA, M.F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M.; KOBASHI, L.S.; ALMEIDA, D.D.; HO, P.L.; TAMBOURGI, D.V. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics**, England, v.9, p.279, 2008.

FERRAT, G.; DARBON, H. An overview of the three dimensional structures of short spider toxins. **Toxin Rev.**, v.24, p.361-384, 2005.

FERRER, V. P.; MARI, T. L. DE; GREMSKI, L. H.; TREVISAN SILVA, D.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, W.; CHAIM, O.M.; SENFF-RIBEIRO, A.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. A novel hyaluronidase from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom (Dietrich's Hyaluronidase): from cloning to functional characterization. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 5, p. e2206, 2013.

FISCHER, M. L. **Biologia e Ecologia de *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934 (Araneae,Sicariidae), no Município de Curitiba, PR.** Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1996.

FISCHER, M.L.; VASCONCELLOS-NETO, J. Microhabitats occupied by *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* (Araneae: Sicariidae) in Curitiba, Paraná, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, United States, v.42, p.756-765, 2005.

FRONTALI, N.; GRASSO, A. Separation of three toxicologically different protein components from the venom of the spider *Latrodectus tredecimguttatus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.106, p.213-218, 1964.

FURUKAWA, K.; ISHIMARU, S. Use of thrombin-like snake venom enzymes in the treatment of vascular occlusive diseases. In: **Medical use of snake venom proteins**. Boca Raton: CRC Press. p.161-173, 1990.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **The American journal of the medical sciences**, United States, v. 304, p.261-267, 1992.

GAJARDO-TOBAR, R. R. Minha experiência sobre loxoscelismo. **Memórias do Instituto Butantan**, Brasil, v.33, p.689-698, 1966.

GEREN, C.R.; CHAN, T.K.; HOWELL, D.E.; ODELL, G.V. Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*). **Archives of biochemistry and biophysics**, United States, v.174, p.90-99, 1976.

GILBERT, S.F. **Embriology: Constructing the organism**. Ed. S. F. Gilbert and A. M. Raunio, Sinauer, Sunderland, 1997.

GIRISK, K. S.; KEMPARAJU, K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. **Life Sci**, v.80, p.921-943, 2007.

GOMEZ, H.F.; MILLER, M.J.; TRACHY, J.W.; MARKS, R.M.; WARREN, J.S. Intradermal anti-*Loxosceles* Fab fragments attenuate dermonecrotic arachnidism. **Academic emergency medicine**, United States, v.6, p.1195-1202, 1999.

GOMEZ, H. F.; MILLER, M. J.; WAGGENER, M. W.; LANKFORD, H. A.; WARREN, J. S. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important North American *Loxosceles* spider species. **Toxicon**, v.39, p.817-824, 2001.

GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; BERTANI, R.; NAGAHAMA, R. H.; BARBOSA, M. F. R. LOXOSCELES NIEDEGUIDONAE (ARANEAE, SICARIIDAE) A NEW SPECIES OF BROWN SPIDER FROM BRAZILIAN SEMI-ARID REGION. **ZOOKEYS**, V. 36, N. 175, P. 27-36, 2012.

GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M.; DE OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A.L.; DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D.V. ONTOGENETIC DEVELOPMENT OF LOXOSCELES INTERMEDIA SPIDER VENOM. **TOXICON**. V. 37, N. 4, P. 627-32, 1999.

GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O.M.; PROBST, C. M.; FERRER, V. P.; NOWATZKI, J.; WEINSCHUTZ, H.C.; MADEIRA, H.M.F.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular Biosystems**, *in press*, 2010

Gremski, L.H.; Trevisan-Silva, D.; Ferrer, V.P.; Matsubara, F.H.; Meissner, G.O.; Wille, A.C.M.; Vuitika, L.; Dias-Lopes, C.; Ullah, A.; de Moraes, F.R.; Chaves-Oliveira, C.; Barbaro, K.C.; Murakami, M.T.; Arni, R.K.; Senff-Ribeiro, A.; Chaim, O.M.; Veiga, S.S.

Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. *Toxicon* 2014,

GRISHIN, E. Black widow spider toxins: the present and the future. *Toxicon*, v.36, p.1693–1701, 1998.

GUATIMOSIM, C.; ROMANO-SILVA, M. A.; CRUZ, J. S.; BEIRAO, P. S.; KALAPOTHAKIS, E.; MORAES-SANTOS, T.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.; GOMEZ, M. V.; PRADO, M. A. A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. **Br J Pharmacol**, v.122, p.591-597, 1997.

HARLOW, E.; LANE, D. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Using antibodies: A laboratory manual, 1988.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: Old obstacles, new directions. **Annals of emergency medicine**, United States, v.44, p.608-624, 2004.

ISBISTER, G.K.; GRAUDINS, A.; WHITE, J.; WARRELL, D. Antivenom treatment in arachnidism. **Clinical toxicology**, United States, v.41, p.291-300, 2003.

ISBISTER, G.K.; WHITE, J. Clinical consequences of spider bites: recent advances in our understanding. **Toxicon**, England, v.43, p.477-492, 2004.

JIANG, S. A.; CAMPUSANO, J. M.; SU, H.; O'DOWD, D. K. Drosophila Mushroom Body Kenyon Cells Generate Spontaneous Calcium Transients Mediated by PLTX-Sensitive Calcium Channels. *Journal of Neurophysiology*, v. 94, n. 1, p. 491-500, July 1, 2005

JUNGO, F.; ESTREICHER, A.; BAIROCH, A.; BOUGUELERET, L.; XENARIOS, I. Animal Toxins: How is Complexity Represented in Databases?. **Toxins**. v.2, p.262-282, 2010.

KALAPOTHAKIS, E.; ARAUJO, S.C.; CASTRO, C.S.; MANDES, T.M.; GOMEZ, M.V.; MANGILI, O.C.; GUBERT, I.C.; CHAVEZ-OLÓRTEGUI, C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, England, v.40, p.1691-1699, 2002.

KALAPOTHAKIS, E.; CHATZAK, M. GONÇALVES-DORNEL, H. de CASTRO, C.S.; SILVESTRE, F.G.; LABORNE, F.V.; de MOURA, J.F.; VEIGA, S.S. CHÁVES-OLÓRTEGUI, C.; GRANIER, C.; BARBARO, K.C. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. **Toxicon**, England, v.50, p.938-946, 2007.

KAPOOR, V. K. Natural toxins and their therapeutic potential. *Indian Journal of Experimental Biology*. v.48, p.228-237, 2010.

KAWAI, N.; MIWA, A.; ABE, T. Spider venom contains specific receptors blockers of glutamatergic synapses. **Brain Res.**, v.247, p.169-171, 1982.

KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. **Cell Biochem. Funct.**, v.24, p.7-12, 2006.

KING, G. F.; GENTZ, M. C.; ESCOUBAS, P.; NICHOLSON, G. M. A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. **Toxicon**, v.52, p.264-276, 2008.

King, G.F., 2011. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Exp. Opin. Biol. Ther.* 11, 1469–1484.

King, G.F., Hardy, M.C., 2013. Spider-venom peptides: structure, pharmacology, and potential for control of insect pests. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 475–496.

KOZLOV S.; MALYAVKA, A.; MCCUTCHEN, B.; LU, A.; SCHEPERS, E.; HERRMANN, R.; GRISHIN, E. A Novel Strategy for the Identification of Toxinlike Structures in Spider Venom. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v.59, p.131-140, 2005.

KING, G. F. The wonderful world of spiders: preface to the special *Toxicon* issue on spider venoms. **Toxicon**, v.43, p.471-475, 2004.

King, G.F.; Hardy, M.C. Spider-Venom Peptides: Structure, Pharmacology, and Potential for Control of Insect Pests. *Annual Review of Entomology* 2013

KRAINER, F. W., DIETZSCH, C., HAJEK, T., HERWIG, C., SPADIUT, O., GLIEDER, A. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered metanol utilization pathway. *Microb. Cell. Fact.*, v. 11, p. 11-22, 2012.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Research review paper microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advanced**, v. 17, n. 4, p. 561-594, 1999.

KUSMA, J.; CHAIM, O. M.; WILLE, A. C. M.; FERRER, V. P.; SADE, Y. B.; DONATTI, L.; GREMSKI, W.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. *Biochimie*, v. 90, n. 11-12, p. 1722–1736, 2008.

LEÃO, R. M.; CRUZ, J. S.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; BEIRÃO, P. S. L. Calcium channel blocking toxins in the venom of *Phoneutria nigriventer*. *J. Venom. Anim. Toxins*, v.3, p.223, 1997.

LEUNG, H. T.; BRANTON, W. D.; PHILLIPS, H. S.; JAN, L.; BYERLY, L. Spider toxins selectively block calcium currents in *Drosophila*. **Neuron**, v.6, p.767-772, 1989.

Li D, Xiao Y, Hu W, Xie J, Bosmans F, Tytgat J, et al. Function and solution structure of hainantoxin-I, a novel insect sodium channel inhibitor from the Chinese bird spider *Selenocosmia hainana*. *FEBS Lett* 2003;555:616–22.

Li D, Xiao Y, Xu X, Xiong X, Lu S, Liu Z, et al. Structure–activity relationships of hainantoxin-IV and structure determination of active and inactive sodium channel blockers. *J Biol Chem* 2004;279:37734–40.

Liang S. An overview of peptide toxins from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* Wang [= *Ornithoctonus huwena* (Wang)]. *Toxicon* 2004;43:575–85.

Liang S, Zhang D, Pan X, Chen Q, Zhou P. Properties amino acid sequence of huwentoxin-I, a neurotoxin purified from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *Toxicon* 1993;31:969–78.

Liu Z, Dai J, Chen Z, Hu W, Xiao Y, Liang S. Isolation and characterization of hainantoxin-IV, a novel antagonist of tetrodotoxin-sensitive sodium channels from the Chinese bird spider *Selenocosmia hainana*. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:972–8.

Liu Z, Dai J, Dai L, Deng M, Hu Z, Hu W, et al. Function and solution structure of Huwentoxin-X, a specific blocker of N-type calcium channels, from the Chinese bird spider *Ornithoctonus huwena*. *J Biol Chem* 2006;281:8628–35.

LUCIANO, M. N.; da SILVA, P. H.; CHAIM, O. M.; SANTOS, V. P.; FRANCO, C. R. C.; SOARES, M. F. S.; ZANATA, S. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W. VEIGA, S. S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom on renal tissue. **The Journal of histochemistry and cytochemistry**, United States, v.52, p.455-467, 2004.

LU, Q.; LAI, R.; ZHANG, Y. Animal Toxins and Human Disease: from Single Component to Venomics, from Biochemical Characterization to Disease Mechanisms, from Crude Venom Utilization to Rational Drug Design. **Zoological Research**. V.31(1), p.2-16, 2010.

LUNG, J.M.; MALLORY, S.B. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. **International journal of dermatology**, United States, v.39, p.287-289, 2000.

MACHADO, L.F.; LAUGESSEN, S.; BOTELHO, E.D.; RICART, C.A.; FONTES, W.; BARBARO, K.C.; ROEPSTORFF, P.; SOUSA, M.V. Proteome analysis of Brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**, Germany, v.5., p.2167-2176, 2005.

MAGGIO, F; KING, G. F. Role of the structurally disordered N- and C-terminal residues in the Janus-faced atracotoxins. **Toxicon**, v.40, p.1355-1362, 2002.

MÁLAQUE, C.M.S.; CASTRO-VALENCIA, J.E.; CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; BARBARO, K.C.; FAN, H.W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo**, Brazil, v. 44, p.139-143, 2002.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v.36, p.1749-1800, 1998.

MARQUES-DA-SILVA, **Loxoscelismo no Estado do Paraná: análise epidemiológica dos acidentes causados por *Loxosceles Heineken* & Lowe, 1832, no período de 1993 a 2000**. Rio de Janeiro. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Osvaldo Cruz.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M.L. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, Brazil; v.38, p.331-335, 2005.

MARTINEZ-VARGAS, A.Z. Loxoscelismo, um problema de salud en el Perú. **Boletín de la oficina sanitaria panamericana**, United States v.103, p.378-386, 1987.

MELLOR, I. R.; USHERWOOD, P. N. R. Targeting ionotropic receptors with polyamine-containing toxins. **Toxicon**, v.43, p.493–508, 2004.

MENZEL, E. J.; FARR, C. Hyaluronidase and its substrate: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. **Cancer Lett**, v.131, p.3-11, 1998.

MILLER, M. S.; ORTEGON, M.; MCDANIEL, C. Negative pressure wound therapy: treating a venomous insect bite. **Int Wound J**, v. 4, p. 88-92, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – FUNASA. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes com animais peçonhentos**. 2ªed. Brasília; 2001.

MONTEIRO, C.L.B.; RUBEL, R.; COGO, L.L.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelism. **Toxicon**, England, v.40, p.409-418, 2002.

MOTA, I.; BARBARO, K.C. Biological and biochemical-properties of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. **Journal of toxicology. Toxin reviews**, United States, v.14, p.401-421, 1995.

NICHOLSON, G. M. Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels. **Toxicon**, v.49, p.490-512, 2007.

NIHEI, K.; KATO, M. J.; YAMANE, T.; KONNO, K. An efficient and versatile synthesis of all structural types of acylpolyamine spider toxins. **Tetrahedron**, v.62 , p.8335–8350, 2006.

Norton RS, Pallaghy PK. 1998. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. **Toxicon** 36:1573–83

OLIVEIRA, K.C.; ANDRADE, R.M.G.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D; TAMBOURGI, D.V. Sexlinked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon**. England, v.37, p.217-221,1999.

OLVERA, A.; RAMOS-CERRILLO, B.; ESTÉVEZ, J.; CLEMENT, H.; DE ROODT, A.; PANIAGUA-SOLÍS, J.; VÁZQUEZ, H.; ZAVALA, A.; ARRUZ, M.S.; STOCK, R.P.; ALAGÓN, A. North and South American *Loxosceles* spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. **Toxicon**, England, v.48, p.64-74, 2006.

OSPEDAL, K.Z.; APPEL, M.H.; NETO, J.F.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **International journal of experimental pathology**, England, v.84, p.287-294, 2002.

PALMA, M.; NAKAJIMA, T. A natural combinatorial chemistry strategy in acylpolyamine toxins from nephilinae orb-web spiders. **Toxin Reviews**, v.24, p.209–234, 2005.

PALUDO, K. S.; GREMSKI, L. H.; VEIGA, S. S.; CHAIM, O. M.; GREMSKI, W.; DE FREITAS BUCHI, D.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; FRANCO, C. R. The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. **Toxicon**, v.47, p.844-853, 2006.

PAULI, I.; PUKA, J.; GUBERT, I.C.; MINOZZO, J.C. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon**, England, v.48, p.123-137, 2006.

PAULI, I; MINOZZO, J.C.; da SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). **Toxicon**, England, v.53, p.660-671, 2009.

PLATNICK, N. I. The World Spider Catalog, Version 14.5; The American Museum of



Natural History: New York, NY, USA, 2013.

PLATINICK, N. I. Advances in spider taxonomy 1988-1991. **The New York Entomological Society**. New York, 1993.

RASH, L.D.; HODGSON W.C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon**, England, v.40, p. 225-254, 2002.

RIBEIRO, L.A.; EICKSTEDT, V.R.D.; RÚBIO, G.B.G.; KONALSAISEN, J.F.; HANDAR, Z.; ENTRES, M.; CAMPOS, V.A.F.P.; JORGE, M.T. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles* no Estado do Paraná (Brasil). **Memórias do Instituto Butantan**, Brazil, v.55, p.19-26, 1993.

RIBEIRO, R.O.; CHAIM, O.M.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, L.H.; SADE, Y.B.; PALUDO, K.S.; SENFF-RIBEIRO, A.; DE MOURA, J.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase-D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**. v. 50, n. 8, p. 1162-74, 2007.

ROHOU, A.; NIELD, J.; USHKARYOV, Y. A. Insecticidal toxins from black widow spider venom. **Toxicon**, v.49, p.531-549, **2007**.

ROSENFELD, G.; NAHAS, L.; CILLO, D. M.; FLEURY, C. T. Envenenamentos por serpentes, aranhas e escorpiões. In: F.C. Prado, Editor, Atualização Terapêutica, Livraria Luso Espanhola e Brasileira, Rio de Janeiro, p.931–944, 1957.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**, Editora. Roca. 7 ed. São Paulo, 2005.

SADE, Y.B.; BÓIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L.H.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Int J Biochem Cell Biol**. v. 44, n. 1, p. 170-7, 2012.

SAEZ, N. J., SENFF, S., JENSEN, J. E., ER, S. Y., HERZIG, V., RASH, L. D., KING, G. F. Spider-venom peptides as therapeutics. **Toxins (Basel)**, v. 2, p. 2851-2871, 2010.

SAHDEV, S., KHATTAR, S. K., SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies. **Mol Cell Biochem**. v. 307. p. 249-264, 2008.

SAMBROOK, J. Molecular cloning : a laboratory manual. 2001.

SAMS, H.H.; HEARTH, S.B.; LONG, L.L.; WILSON, D.C.; SANDERS, D.H.; KING, L.E. Nineteen documented cases of *Loxosceles reclusa* envenomation. **Journal of the american academy of dermatology**, United States, v.44, p.603-608, 2001.

SATAKE, H.; VILLEGAS, E.; OSHIRO, N.; TERADA, K.; SHINADA, T.; CORZO, G. Rapid and efficient identification of cysteine-rich peptides by random screening of a venom gland cDNA library from the hexathelid spider *Macrothele gigas*. **Toxicon**, v. 44, n. 2, p. 149-156, 2004

SCHENONE, H.; LETONJA, T. Notas sobre la biología y distribución geográfica de las arañas del género *Loxosceles*. **Boletín chileno de parasitología**, Chile, v.30, p.27-29, 1975.

SCHENONE, H., SAAVEDRA, T., ROJAS, A. & VILLARREAL, F. Loxoscelismo en Chile: estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. **Rev. Inst. Med. Trop., Brazil**, v.31, p.403-415, 1989.

SENFF-RIBEIRO, A.; HENRIQUE DA SILVA, P.; CHAIM, O. M.; GREMSKI, L. H.; PALUDO, K. S.; BERTONI DA SILVEIRA, R.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotechnol Adv**, v.26, p.210-218, 2008.

SEZERINO, U.M.; ZANNIN, M.; COELHO, L.K.; GONÇALVES, J.; GRANDO, M.; MATTOSINHO, S.G.; BARBARO, K.C. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Transactions of the Royal Society of tropical medicine and hygiene**, England, v.92, p.546–548, 1998.

SHUSTER, S; FROST G. I.; CSOKA, A. B.; FORMBY, B.; STERN, R. Hyaluronidase reduces human breast cancer xenografts in SCID mice. **Int J Cancer**, v.102, p.192–197, 2002.

SINAN - SISTEMA NACIONAL DE NOTIFICAÇÕES DE AGRAVOS, **Ministério da Saúde**, BRASIL, 2009. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>> acesso em: 23/03/2009.

SINAN - SISTEMA NACIONAL DE NOTIFICAÇÕES DE AGRAVOS, **Ministério da Saúde**, BRASIL, 2010. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>> acesso em: 11/09/2010.

SKINNER, W. S.; ADAMS, M. E.; QUISTAD, G. B.; KATAOKA, H.; CESARIN, B. J.; ENDERLIN, F. E.; SCHOOLEY, D. A. Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. **J. Biol. Chem.**, v.264, p.2150-2155, 1989.

SOLLOD, B. L.; WILSON, D.; ZHAXYBAYEVA, O.; GOGARTEN, J. P.; DRINKWATER, R.; KING, G. F. Were arachnids the first to use combinatorial peptide libraries?. **Peptides**, v.26, p.131-139, 2005.

SOUTAR, R. L.; GINSBERG, J. S. Anticoagulant therapy with ancrod. **Clin. Rev. Oncol. Hematol.**, v.15, p.23-33, 1993.

SPADIUT, O., OLSSON, L., BRUMER, H. A comparative summary of expression. Systems for the recombinant production of galactose oxidase. **Microb. Cell. Fact.**, v. 13, p.1-13, 2010.

STROMGAARD, K., JENSEN, L. S., VOGENSEN, S. B. Polyamine toxins: development of selective ligands for ionotropic receptors. **Toxicon**, v. 45, p.249-254, 2005.

SWANSON, D.L.; VETTER, R.S. Loxoscelism. **Clinics in dermatology**, United States, v.24, p.213-221, 2006.

TEDFORD, H. W.; SOLLOD, B. L.; MAGGIO, F.; KING, G. F. Australian funnel-web spiders: master insecticide chemists. **Toxicon**, v.43, p.601-614, 2004.

TREVISAN-SILVA, D.; GREMSKI, L. H.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; MEISSNER, O. M.; MANGILI, O. C.; BARBARO, K. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; SENFF-RIBEIRO, A. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). **Biochimie**, France, v.92, p.21-32, 2010.

USKARYOV, Y.  $\alpha$ -Latrotoxin: from structure to some functions. **Toxicon**, v.40, p.1-5, 2002.

VASSILEVSKY, A. A.; KOZLOV, S. A.; GRISHIN, E. V. Molecular Diversity of Spider Venom. **Biochemistry**, v.74, p.1505-1534, 2009.

VEIGA, S.S.; da SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J.; PEREIRA, A.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serineproteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, England, v.38, p.825-839, 2000a.

VEIGA, S.S.; FEITOSA, L.; SANTOS, V.L.P.; SOUZA, G.A.; RIBEIRO, A.S.; PORCIONATTO, M.A.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R.; GREMSKI, W. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. **The Histochemical journal**, Netherlands, v.32, p.397-408, 2000b.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; BRAZ, A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Brasilian Journal of medical and biological research**, Brazil, v.34, p.843-850, 2001a.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; FRANCO, C.R.C.; TRINDADE, E.S.; PORCIONATTO, M. A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. *In vivo* and *in vitro* cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thrombosis research**, United States, v.102, p.229-237, 2001b.

VETTER, R.S.; VISSCHER, P.K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. **International journal of dermatology**, United States, v.37, p.481-496, 1998.

VETTER, R. S. ISBISTER, K.G. Medical aspects of spiders bits. **Annual review of entomology**, United States, v.53, p.409-429, 2008.

VUITIKA, L.; GREMSKI, L.H.; BELISÁRIO-FERRARI, M.R.; CHAVES-MOREIRA, D.; FERRER, V.P.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. Brown spider phospholipase-D containing a conservative mutation (D233E) in the catalytic site: identification and functional characterization. *J Cell Biochem*, v. 114, n. 11, p. 2479-92, 2013.

WANG, X.; CONNOR, M.; WILSON, D.; WILSON H. I.; NICHOLSON, G. M.; SMITH, R.; SHAW, D; MACKAY, J. P.; ALEWOOD, P. F.; CHRISTIE, M. J.; KING, G. F. Discovery and Structure of a Potent and Highly Specific Blocker of Insect Calcium Channels. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p.40306–40312, 2001.

Wang M, Guan X, Liang S. The cross channel activities of spider neurotoxin huwentoxin- I on rat dorsal root ganglion neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;357:579–83.

Wang Z, Zeng B, Li W, Yan H. Study on the biological characteristics of *Ornithoctonus huwena*. *J Beihua Univ (Nat Sci)* 2002;4:298–9 [Chinese].

WILLE, A.C.; CHAVES-MOREIRA, D.; TREVISAN-SILVA, D.; MAGNONI, M.G.; BOIAFERREIRA, M.; GREMSKI, L.H.; GREMSKI, W.; CHAIM, O.M.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA SS. Modulation of membrane phospholipids, the cytosolic calcium influx and cell proliferation following treatment of B16-F10 cells with recombinant phospholipase-D from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon*, v. 1; n. 67, p. 17-30, 2013.

WILLIAMS, S. T.; KHARE V. K.; JOHNSTON, G. A.; BLACKALL, D. P. Severe intravascular hemolysis associated with brown recluse spider envenomation. A report of two cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol*, v.104, p.463-467, 1995.

WRIGHT, R.P.; ELGERT, K.; CAMPBELL, B.J.; BARRET, J.T. (1973). Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.159, p.415-426, 1973.

YAMAJI, N. M.; LITTLE, M. J.; NISHIO, H.; BILLEN, B.; VILLEGAS, E.; NISHIUCHI, NICHCHOLSON, G. M., CORZO, G. Synthesis, solution structure, and phylum selectivity of a spider delta-toxin that slows inactivation of specific voltage-gated sodium channel subtypes. *J Biol Chem*, v. 284, p. 24568-24582, 2009.

YOUNG, A.R.; PINCUS, S.J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon*, England, v.39, p.391-400, 2001.

Xiao Y, Bingham JP, Zhu W, Moczydlowski E, Liang S, Cummins TR. Tarantula huwentoxin-IV inhibits neuronal sodium channels by binding to receptor site 4 and trapping the domain ii voltage sensor in the closed configuration. *J Biol Chem* 2008;283:27300–13.

Xiao Y, Liang S. Inhibition of neuronal tetrodotoxin-sensitive Na<sup>+</sup> channels by two spider toxins: hainantoxin-III and hainantoxin-IV. *Eur J Pharmacol* 2003;477:1–7.

Xiao Y, Tang J, Hu W, Xie J, Maertens C, Tytgat J, et al. Jingzhaotoxin-I, a novel spider neurotoxin preferentially inhibiting cardiac sodium channel inactivation. *J Biol Chem* 2005;280:12069–76.

ZANETTI, V.C.; da SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. **Blood coagulation and fibrinolysis**, England, v.13, p.135-148, 2002.

ZLOTKIN, E. The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annu Rev Entomol*, v. 44, p. 429-55, 1999.

# ANEXOS



## Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 29801-4</b>	<b>Data da Emissão: 16/09/2014 15:05</b>	<b>Data para Revalidação*: 16/10/2015</b>
------------------------	--	---

\* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

### Dados do titular

Nome: Silvio Sanches Veiga	CPF: 078.970.128-67
Título do Projeto: Avaliação bioquímica e biológica de toxinas toxoscélicas recombinantes	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de veneno, hemolinfa e glândulas produtoras de veneno	08/2011	12/2014
2	Coleta dos espécimes de aranha-marrom	08/2011	12/2014
3	Processamento das amostras coletadas (análises qualitativas e quantitativas do veneno e hemolinfa)	09/2011	12/2014
4	Processamento das amostras coletadas (extração de RNA total das glândulas, análises qualitativas)	09/2011	12/2014
5	Desenho de oligonucleotídeos específicos para as toxinas de interesse	10/2011	12/2013
6	Obtenção das sequências completas das toxinas de interesse	10/2011	12/2013
7	Clonagem das sequências das proteínas maduras em vetor	11/2011	12/2013
8	Transfecção e Expressão das proteínas Recombinantes	12/2011	12/2014
9	Confecção de artigos científicos e apresentação de trabalhos em congressos da área	12/2011	12/2014
10	Purificação das Proteínas Recombinantes	12/2011	12/2014
11	Transformação e Expressão das proteínas Recombinantes	12/2011	12/2014
12	Análises de atividade biológica das proteínas recombinantes	02/2012	12/2014
13	Análises em Microscopia Confocal, Citometria de Fluxo e Espectropolarímetro	02/2012	12/2014
14	Imunização de animais para verificação da imunogenicidade de toxinas recombinantes	04/2012	01/2014
15	Realização de imunoenaios para pesquisa de terapias racionais	04/2014	07/2014
16	experimentos de Cristalografia das toxinas recombinantes de interesse	05/2014	12/2014
17	Análise dos dados cristalográficos	07/2014	12/2014

### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NAO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

### Equipe

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 74522244**





## Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 29801-4</b>	<b>Data da Emissão: 16/09/2014 15:05</b>	<b>Data para Revalidação*: 16/10/2015</b>
------------------------	--	---

\* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

### Dados do titular

Nome: Silvio Sanches Veiga	CPF: 078.970.128-67
Título do Projeto: Avaliação bioquímica e biológica de toxinas toxoscélicas recombinantes	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Andrea Senff Ribeiro	Pesquisador	024.183.219-59	36797924 SSP-PR-PR	Brasileira
2	Olga Meiri Chaim	Pesquisador	034.415.729-63	72178823 SSP-PR-PR	Brasileira

### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CURITIBA	PR	Curitiba e Região Metropolitana, Lapa	Fora de UC Federal
2	CURITIBA	PR	Curitiba, Lapa e Quitandinha	Fora de UC Federal

### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Arachnida
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Arachnida (*Qtde: 1500)
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de invertebrados silvestres em cativeiro	Arachnida

\* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

### Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Captura manual
---	---	----------------

### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 74522244**





### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 29801-4</b>	<b>Data da Emissão: 16/09/2014 15:05</b>	<b>Data para Revalidação*: 16/10/2015</b>
------------------------	--	---

\* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

#### Dados do titular

Nome: Silvio Sanches Veiga	CPF: 078.970.128-67
Título do Projeto: Avaliação bioquímica e biológica de toxinas toxoscélicas recombinantes	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

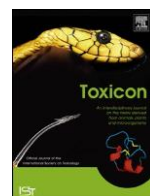
\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 74522244**







# A novel ICK peptide from the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland: Cloning, heterologous expression and immunological cross-reactivity approaches



Fernando Hitomi Matsubara<sup>a</sup>, Luiza Helena Gremski<sup>a</sup>, Gabriel Otto Meissner<sup>a</sup>,  
Eduardo Soares Constantino Lopes<sup>a</sup>, Waldemiro Gremski<sup>a,b</sup>,  
Andrea Senff-Ribeiro<sup>a</sup>, Olga Meiri Chaim<sup>a</sup>, Silvio Sanches Veiga<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Jardim das Américas, 81531-990 Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>b</sup> Catholic University of Paraná, Health and Biological Sciences Institute, Curitiba, Paraná, Brazil

## article info

### Article history:

Received 13 March 2013

Received in revised form 10 May 2013

Accepted 15 May 2013

Available online 8 June 2013

### Keywords:

*Loxosceles intermedia*

Spider venom

ICK peptide

Knottin

## abstract

The venom of a *Loxosceles* spider is composed of a complex mixture of biologically active components, consisting predominantly of low molecular mass molecules (3–45 kDa). Transcriptome analysis of the *Loxosceles intermedia* venom gland revealed ESTs with similarity to the previously described LiTx peptides. Sequences similar to the LiTx3 isoform were the most abundant, representing approximately 13.9% of all ESTs and 32% of the toxin-encoding messengers. These peptides are grouped in the ICK (Inhibitor Cystine Knot) family, which contains single chain molecules with low molecular mass (3–10 kDa). Due to their high number of cysteine residues, ICK peptides form intramolecular disulfide bridges. The aims of this study were to clone and express a novel ICK peptide isoform, as well as produce specific hyperimmune serum for immunoassays. The corresponding cDNA was amplified by PCR using specific primers containing restriction sites for the XhoI and BamHI enzymes; this PCR product was then ligated in the pET-14b vector and transformed into *E. coli* AD494 (DE3) cells. The peptide was expressed by IPTG induction for 4 h at 30 °C and purified by affinity chromatography with Ni-NTA resin. Hyperimmune serum to the recombinant peptide was produced in rabbits and was able to specifically recognize both the purified recombinant peptide and the native form present in the venom. Furthermore, the recombinant peptide was recognized by antisera raised against *L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta* whole venoms. The recombinant peptide obtained will enable future studies to characterize its biological activity, as well as investigations regarding possible biotechnological applications.

2013 Published by Elsevier Ltd.

## 1. Introduction

The development of a venom apparatus extensively contributed to the evolutionary success of spiders. This acquisition allowed spiders to prey for food and defend themselves from predators (Rash and Hodgson, 2002; King

and Hardy, 2013). Throughout their history, spiders became one of the main terrestrial predators through the evolutionary improvement of their venom, which has established itself as a diverse library of high-potential lethal and/or harmful toxins (Escoubas, 2006; Escoubas et al., 2008).

The venom of *Loxosceles* spiders is a colorless and crystalline liquid produced by a pair of glands situated on the cephalothorax (dos Santos et al., 2000; da Silveira et al., 2002). The volume of venom produced by these glands can be influenced by many features, such as the sex, size, and

\* Corresponding author. Fax: +55 41 3266 2042.

E-mail address: [veigass@ufpr.br](mailto:veigass@ufpr.br) (S.S. Veiga).

nutritional state of the spider, as well as the species type. Despite all of these factors, the volume rarely exceeds a few microliters, which can contain between 20 and 200 mg total protein (Sams et al., 2001; Binford and Wells, 2003; de Oliveira et al., 2005).

The full content of *Loxosceles* venom is not yet fully understood, although many studies have shown that it contains a heterogeneous mixture of biologically active compounds, mainly proteins with toxic and/or enzymatic activities (da Silveira et al., 2002, 2007; da Silva et al., 2004; Chaim et al., 2006). Electrophoretic analysis showed that *Loxosceles* venom predominantly consists of low molecular mass compounds (3–45 kDa), with high molecular mass compounds present in smaller concentrations (Veiga et al., 2000; Gremski et al., 2010). Many toxins have already been identified, and some of these have been characterized in terms of biochemical and/or biological aspects, such as phospholipases D (Chaim et al., 2006; da Silveira et al., 2006, 2007; Appel et al., 2008), metalloproteases (Feitosa et al., 1998; da Silveira et al., 2002; Trevisan-Silva et al., 2010), serine proteases (Veiga et al., 2000), hyaluronidases (da Silveira et al., 2002) and translationally-controlled tumor protein (TCTP) (Sade et al., 2012).

*Loxosceles intermedia* venom also contains small peptides with a molecular mass range of 5–8 kDa, which present insecticidal activity upon economic interest larvae. These peptides were purified from venom in their native form using a combination of chromatography methodologies and were submitted for amino terminus sequencing and cloning. This previous study identified 3 putative isoforms of these peptides, which were named LiTx1, LiTx2 and LiTx3 (de Castro et al., 2004). Later, a fourth isoform, named LiTx4, was identified and included in the GenBank Database (Accession Number: Q27Q53). Bioinformatic analyses suggest that these peptides possess a characteristic structural motif known as Inhibitor Cystine Knot; therefore, these peptides were named ICK peptides or knottins (Pallaghy et al., 1994; Gremski et al., 2010; Daly and Craik, 2011). This class of peptides is recognized as important components in the venom of marine cone snails (Oliveira et al., 1990; Oliveira and Cruz, 2001) and scorpions (Mosbah et al., 2000; Horita et al., 2011). These peptides are commonly single chain molecules ranging from 3 to 10 kDa and contain 6–14 cysteine residues in their primary sequence, which establish intramolecular disulfide bridges (Pallaghy et al., 1994; Grishin, 1999). Two of these disulfide bridges create a ring-like structure that is crossed by a third disulfide bridge, completing the knot structure that gives the motif its name (Norton and Pallaghy, 1998; Windley et al., 2012). Most ICK peptides from spiders are characterized by the neurotoxic properties they exhibit upon ion channels and receptors expressed in the nervous system of insects and mammals (Dutertre and Lewis, 2010). This property has been explored from both a biotechnological standpoint, in the development of bioinsecticides to control insect pests and insect vectors of diseases, as well as from a therapeutic standpoint, as drugs with analgesic and antiarrhythmic effects (Lewis and Garcia, 2003; Escoubas and Bosmans, 2007; Saez et al., 2010; Windley et al., 2012). Moreover, because ICK peptides target ion channels and receptors, they make useful tools in understanding

and characterizing the dynamic mechanisms of these structures (Dutertre and Lewis, 2010).

Recently, Gremski et al. (2010) analyzed the transcriptome of the *Loxosceles intermedia* venom gland and revealed the profile of expressed toxins. Indeed, sequences similar to the 4 previously identified isoforms of the ICK peptides were represented and corresponded to 53.5% of all the toxin-encoding messengers sequenced. The high expression of LiTx transcripts corroborates with the venom purposes of paralyzing and killing preys and predators (Rash and Hodgson, 2002; Escoubas, 2006). Particularly, ESTs similar to the LiTx3 isoform were the most abundant, comprising 13.9% of the total toxin transcripts annotated (Gremski et al., 2010). The LiTx3 sequence encodes a peptide of 53 amino acids, with a molecular mass of 5.6 kDa, and a pI of approximately 8.76. Comparison of the LiTx3 sequence with other characterized toxins indicated that LiTx3 putatively acts upon voltage-gated Na<sup>v</sup> channels (de Castro et al., 2004).

Here, we describe the molecular cloning, heterologous expression, polyclonal antibody production and evaluation of the cross-reactivity of a novel peptide with significant similarity to the ICK family of peptides from *Loxosceles* venom. This peptide was named U<sub>2</sub>-sacaritoxin-Li1b (U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b) according to the rational nomenclature proposed by King et al. (2008). Thus, this work aims to contribute to the lack of literature about the ICK peptides from *Loxosceles* spiders, as well as garner data that may lead to the generation of biotechnological products or tools for studying the molecules targeted by this toxin.

## 2. Material and methods

### 2.1. Reagents

Salts and organic acids were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Molecular mass markers were purchased from Sigma (St. Louis, USA). Wizard Plus SV Miniprep Kit and the pGEM-T vector were acquired from Promega (Madison, USA). IPTG and Trizol were purchased from Invitrogen (Carlsbad, USA). We acquired DNA molecular mass standards, X-Gal, Taq DNA polymerase, Pfu DNA polymerase, T4 DNA ligase, restriction enzymes and dNTPs from Fermentas (Hanover, MD, USA). Whole venom from *L. intermedia* was extracted from wild-caught spiders (Feitosa et al., 1998) in accordance with the Brazilian Federal System for Authorization and Information on Biodiversity (SISBIO-ICMBIO, N 29801-1). Hyperimmune sera against *L. laeta* and *L. gaucho* whole venom were gently donated by Dr. Katia C. Barbaro at the Instituto Butantan (São Paulo, São Paulo, Brazil).

### 2.2. Molecular cloning of the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b cDNA: RACE and PCR reactions

Basic molecular cloning techniques were performed according to the protocols described by Sambrook and Russell (2001) with some modifications. The initial sequence of interest, an isoform of the LiTx3 peptide previously described by de Castro et al. (2004), was derived from the simultaneous study of the transcriptome of the venom gland

of *L. intermedia* produced by [Gremski et al. \(2010\)](#). However, this annotated sequence was only a partial one, and therefore the RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) method was employed to obtain the complete sequence. For this protocol, total RNA was extracted from *L. intermedia* venom glands using the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and mRNA was purified using the FastTrack 2.0 mRNA Isolation Kit (Invitrogen). To obtain the complete 3' end of the cDNA sequence, first strand cDNA synthesis was performed using the oligo(dT)17 primer (5' CGGTACCATG-GATCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTT 3') and the Improm-II Reverse Transcriptase Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The modified cDNA was recovered following ethanol precipitation in the presence of ammonium acetate. This sequence was amplified by PCR with a forward gene-specific primer (5' ATG-CATTAAATCTGGTCAG 3') and the oligo (dT) 17 primer. The resulting PCR product was gel-purified using the Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA), ligated into the pGEM-T vector (Promega) and sequenced on both strands by using BigDye (Applied Biosystems, Warrington, UK) on a 3500 Genetic Analyzer automatic sequencer (Applied Biosystems). Sequence analysis revealed that the cloned product was an ICK peptide. Based on this sequence, a 5' RACE gene-specific primer (5' ACTGCCGTCAAATTGTTGTG 3') was designed to determine the 5' end of the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b cDNA sequence. For this reaction, first strand synthesis was performed using the 5' RACE/U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b gene-specific primer and the Improm-II Reverse Transcriptase Kit. The cDNA was precipitated as mentioned above and was subsequently polyadenylated with terminal deoxynucleotidyl transferase (Fermentas, Hanover, MD, USA) following the manufacturer's instructions. The modified cDNA was amplified by PCR using the 5' RACE/U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b gene-specific primer and the oligo(dT)17 primer. The resulting PCR product reaction was gel-purified, cloned into the pGEM-T vector and sequenced as described above. Following the determination of the 3' and 5' ends by RACE, the complete cDNA sequence was amplified using specific primers (primer forward: 5' TCTTCAAGGCAGAAAGAAC 3'; primer reverse 5' GTGATTCTTTATTGTAAT 3') and then the construct was cloned and sequenced again for complete sequence confirmation, as above mentioned.

### 2.3. Subcloning and recombinant expression of U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide

The cDNA sequence of the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b mature peptide associated to the propeptide sequence was amplified using a high fidelity PCR polymerase using the previous construct as a template. Primers were designed to contain a XhoI restriction site (forward primer: 5' CCGCTCGAGGAAGAGGTGATTGAAAGTGAC 3') and a BamHI site (reverse primer: 5' CGGGATCCTTAACCTTTTGTCTATAGTC 3'). The PCR product was digested with XhoI and BamHI restriction enzymes and then subcloned into the pET-14b vector (Novagen, Madison, USA) digested with the same enzymes. The recombinant construct was expressed as a tagged protein, with a 6x His-Tag at the N-terminus and a 13 amino acid linker including a thrombin cleavage site between the

6x His-Tag and the cloned sequence. The expression construct was transformed into *E. coli* AD494(DE3) cells and plated on LB plates containing 100 mg/mL ampicillin and 15 mg/mL kanamycin. Single colonies containing the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b/pET-14b constructs were inoculated into LB broth (100 mg/mL ampicillin and 15 mg/mL kanamycin) and grown overnight at 37 °C. This culture was diluted 1:100 into 1 L fresh LB broth plus ampicillin and kanamycin and incubated at 37 °C until the OD<sub>550</sub> was 0.5. Recombinant expression was induced by the addition of IPTG (isopropyl β-D-thiogalactoside) to a final concentration of 0.5 mM and incubated for 3.5 h at 30 °C. Cells were harvested by centrifugation (4000 g, 7 min, 4 °C), resuspended in 40 mL of extraction buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole) and frozen at -20 °C overnight.

### 2.4. U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b recombinant peptide purification

Cell suspensions were thawed and disrupted by 8 cycles of 25 s sonication at high intensity. Cell lysates were centrifuged (9000 g, 30 min), and the supernatants were incubated with 500 mL Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose beads for 1 h at 4 °C with gentle agitation. The suspensions were loaded into a column, and the packed gel was washed with the appropriate buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 500 mM NaCl, 40 mM imidazole). The recombinant protein was eluted with buffer containing 50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 500 mM NaCl and 250 mM imidazole. The eluate was collected, analyzed by 18% SDS-PAGE under reducing conditions and dialyzed against phosphate buffered saline (PBS).

### 2.5. Production of hyperimmune serum against the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b recombinant peptide

New Zealand rabbits (2–3 kg) were used to obtain hyperimmune serum that recognized the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b recombinant peptide. After collection of the pre-immune serum, each animal received an initial injection of 100 mg of the recombinant peptide and complete Freund's adjuvant (Sigma; St Louis, MO) distributed in 3 injection sites (one subcutaneous and two intramuscular). Three booster injections of 100 mg of peptide in incomplete Freund's adjuvant were given at 3-week intervals. Blood samples were withdrawn 12 days after the last injection, and the presence of polyclonal antibodies against the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide was evaluated by immunoblotting ([Harlow and Lane, 1988](#)). All experimental protocols using animals were performed according to the "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH Publication no. 85-23, revised 1985), "Brazilian Federal Laws" and the Ethical Committee Agreement number 256 of Federal University of Paraná.

### 2.6. Gel electrophoresis and immunoblotting

Peptide concentration was determined using the Coomassie Blue method (BioRad, Hercules, USA) following [Bradford \(1976\)](#). Protein analysis was performed using 18% SDS-PAGE under reducing conditions following [Laemmli \(1970\)](#), and gels were stained with Coomassie Blue dye.

For immunoblotting, recombinant peptide sample (5 mg) was transferred onto nitrocellulose filters and immunodetected using the hyperimmune serum against the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide. Additionally, sample of *L. intermedia* whole venom (15 mg) was examined using hyperimmune serum against the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b. Alkaline-phosphatase-conjugated anti-rabbit goat IgG was used as a secondary antibody and the reaction was developed with BCIP/NBT as substrate.

### 2.7. Immunological cross-reactivity of the recombinant U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide with anti-whole venom sera from *Loxosceles* spiders

To evaluate the presence of denatured epitopes similar to those found in the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide, samples of the purified recombinant peptide (5 mg) were examined by immunoblotting using the hyperimmune antisera against *L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta* crude venoms as a primary antibody. The reaction was developed as described above.

## 3. Results

### 3.1. Molecular cloning and sequence analysis of U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b

To determine the full coding sequence for the brown spider ICK peptide, 3<sup>0</sup> RACE and 5<sup>0</sup> RACE methods were performed. By overlapping the generated sequences, we obtained the full length-cDNA. Analysis based on the nucleotide and the deduced amino acid sequences showed that the cDNA encoding a peptide which contains 3 distinct parts: a 5<sup>0</sup>-untranslated region (UTR), an open reading frame, and a 3<sup>0</sup>-UTR. The 5<sup>0</sup>-UTR is 50 nucleotides long; the 3<sup>0</sup>-UTR is 75 nucleotides long and contains the

polyadenylation signal AATAAA with the polyadenylated region 14 nucleotides downstream of this signal (Fig. 1).

The open reading frame is comprised of 258 nucleotides, and it encodes a precursor molecule of 86 amino acid residues. The predicted peptide-encoded sequence was submitted to the SignalP (Petersen et al., 2011) and SpiderP (Herzig et al., 2011) algorithms to predict the putative signal peptide and propeptide regions, respectively. These algorithms predicted that the first 20 amino acids residues correspond to a hydrophobic signal peptide, and the following 13 residues are related to a glutamate-rich propeptide. Finally, the remaining 53 residues make up the mature peptide (Fig. 1).

### 3.2. Co-translational and post-translational modification predictions

Through a combination of bioinformatic predictions and sequence similarity, the coding sequence for the putative mature peptide was examined to identify possible post-translational modifications.

Consensus sites for N-myristoylation were determined using the NMT – MYR Predictor algorithm (<http://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPLpredictor.htm>) (Maurer-Stroh et al., 2002). This analysis showed that the first Gly residue in the deduced mature peptide formed after propeptide cleavage (GCIKSG) is a potential site for N-myristoylation (Fig. 1).

C-terminal amidation is another recurring modification found in spider peptides (Windley et al., 2012). The TalTX-1, TalTX-2 and TalTX-3 peptides from *Tegenaria agrestis* possess a Lys–Gly dipeptide codified at the C-terminal end of the mature sequence. This sequence undergoes proteolytic cleavage, resulting in the removal of the Gly residue and the subsequent amidation of the Lys residue (Johnson

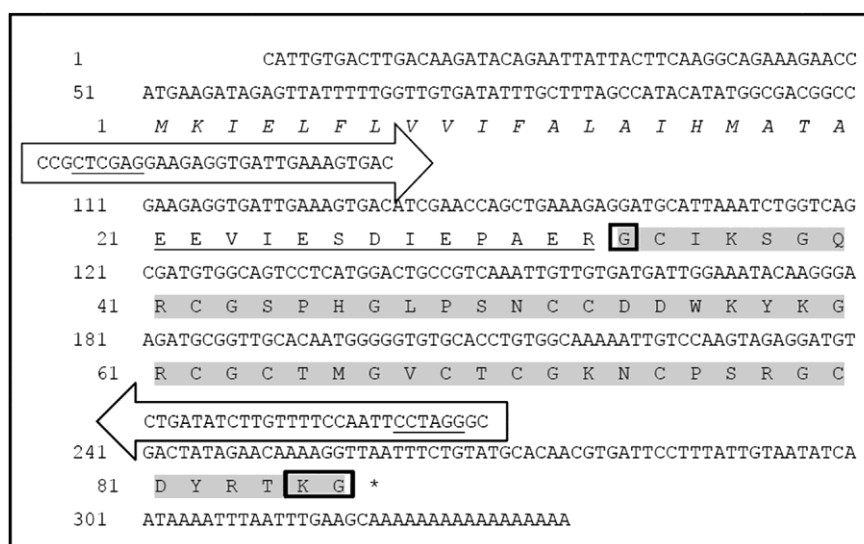


Fig. 1. Molecular cloning of the recombinant U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide from the *L. intermedia* venom gland. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the cloned cDNA. In the protein sequence, the predicted signal peptide is in italic font, the propeptide is underlined and the mature sequence is grey shaded. The putative Gly residue for N-myristoylation (highlighted in box) and the putative consensus Lys–Gly for C-amidation (highlighted in another box) are also shown. Arrows show the annealing positions for primers used for subcloning into the pET-14b expression vector (including underlined restriction sites). The asterisk corresponds to the TAA stop codon.



et al., 1998). The same consensus sequence was observed in the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b sequence (Fig. 1). Based on the sequence similarity and on the presumption that this sequence is a signal for amidation (Johnson et al., 1998), we hypothesized a putative C-amidation site in the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide.

The most striking characteristic of the ICK peptides is the presence of intramolecular disulfide bridges established between cysteine residues (Vassilevski et al., 2009). The U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide contains ten cysteine residues, which suggest the formation of five disulfide bridges; 3 of these bridges are involved in the organization of the ICK motif. The Knoter1D algorithm available through the KNOTTIN database (<http://knottin.cbs.cnrs.fr/>) was used to determine which three disulfide bonds form the knot (Gracy et al., 2008). This analysis revealed that disulfide pairings between the Cys2 and Cys20, Cys9 and Cys29, and Cys19 and Cys38 residues (where the numbers correspond to the relative position of the Cys residues in the mature sequence of the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b) are associated with the knot structure. Furthermore, the cysteine residues that establish the predicted disulfide bonds of the ICK motif showed the same pairing pattern found in the d-AMATX-P11a peptide from *Pireneitega luctuosa* (Corzo et al., 2000) and in the m-AGTX-Aa1a peptide from *Agelenopsis aperta* (Skinner et al., 1989). The same pattern is also predicted to the m-AGTX-Hc1a and m-AGTX-Hc1b peptides from *Hololena curta* (Stapleton et al., 1990) and to the U<sub>3</sub>-AGTX-Ao1a from *Agelena orientalis* (Kozlov et al., 2005) (Fig. 2).

### 3.3. Multiple sequence alignment analysis and sequence-structure relationship of the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide with other ICK peptides

To investigate the similarities of the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide with other sequences, we performed a BLAST search on the ArachnoServer 2.0 Spider Toxin Database Server (Altschul et al., 1997; Herzig et al., 2011) using the deduced amino acid sequence of the mature peptide. As a result, a significant match of 86% identity was found with the LiTx3 peptide (de Castro et al., 2004). Lower similarities were observed with other sequences, such as U<sub>11</sub>-theraphotoxin-Hh1b, U<sub>11</sub>-theraphotoxin-Hh1c, U<sub>11</sub>-theraphotoxin-Hh1a and m/u-theraphotoxin-Hh1b from *Haplopelma huenum* (Jiang et al., 2008a, 2008b), d-Amaurobitoxin-P11b and d-Amaurobitoxin-P11a from *Pireneitega luctuosa* (Corzo et al., 2000), U<sub>9</sub>-ctenitoxin-Pn1a, k-ctenitoxin-Pn1a and m-ctenitoxin-Pn1a from *Phoneutria nigriventer* (Diniz et al., 1993;

Kushmerick et al., 1999; Cardoso et al., 2003), U<sub>9</sub>-agatoxin-Ao1a from *Agelena orientalis* (Kozlov et al., 2005) and U<sub>1</sub>-lycotoxin-Ls1z and U<sub>1</sub>-lycotoxin-Ls1mm from *Lycosa sin-goriensis* (Zhang et al., 2010). The similarity amongst all these sequences is directly related to the conserved position of cysteine residues shared by most of them, which is represented in Fig. 3.

Based on the predicted mature sequence of the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide, we also assessed the relationship between this peptide and other ICK peptides containing 10 cysteine residues and with known target specificity from other spider species. The resulting data were plotted in a similarity cladogram and showed that the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b sequence closely clustered with m-HXTX-Mg2a from *Macrothele gigas* (Corzo et al., 2003) and with u-PLTX-Pt1a from *Plectreurys tristis* (Branton et al., 1987). Furthermore, it was observed that U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b sequence is more internally positioned, showing closer relationship to the d-ctenitoxins, which act upon sodium channels, than to u-ctenitoxins and u-oxotoxins, which act upon calcium channels (Fig. 4).

### 3.4. U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b recombinant expression and purification

We have subcloned the cDNA corresponding to the predicted pro-form of the peptide for posterior heterologous expression in bacteria (mature sequence including the propeptide segment of the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide). This deduced pro-form has a calculated molecular mass of 9.4 kDa and a theoretical pI of 8.7. The U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b pro-form was expressed as an N-terminal 6 His-Tag fusion protein under the control of T7 promoter from the pET-14b plasmid. These expression experiments were performed in the *E. coli* strain AD494(DE3); this strain was chosen because it is thioredoxin reductase-deficient (trxB<sup>-</sup>), which favors disulfide bridge formation in the *E. coli* cytoplasm.

The optimal parameters for the heterologous expression of the recombinant peptide (temperature, amount of inducer IPTG and time of induction) were determined using a small scale test, which revealed optimal expression with 0.5 mM IPTG for 3.5 h at 30 °C. By using these conditions, it was possible to obtain the expressed peptide from the soluble fraction of cell lysates. Purification of the peptide was made under native conditions using Ni<sup>2+</sup>-chelating chromatography; large-scale purification resulted in a yield of 5.3 mg of recombinant peptide per liter of culture. The peptide eluted was observed as both monomer and dimer in both SDS-PAGE and immunoblotting analyses. The electrophoretic mobility



Fig. 2. Prediction of disulfide pairing pattern associated with the knot structure of the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide by the Knoter1D algorithm from KNOTTIN database (<http://knottin.cbs.cnrs.fr/>). The cysteine framework associated with U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide (in bold) is similar to other ICK peptides from *Hololena curta* (m-AGTX-Hc1a and m-AGTX-Hc1c), *Agelenopsis aperta* (m-AGTX-Aa1a), *Agelena orientalis* (U<sub>3</sub>-AGTX-Ao1a) and *Pireneitega luctuosa* (d-AMATX-P11a). Sequences accession numbers: m-AGTX-Hc1a (UniProt: P15967), m-AGTX-Hc1c (UniProt: P15968), m-AGTX-Aa1a (UniProt: P11057), U<sub>3</sub>-AGTX-Ao1a (UniProt: Q5Y4V8) and d-AMATX-P11a (UniProt: P83256).

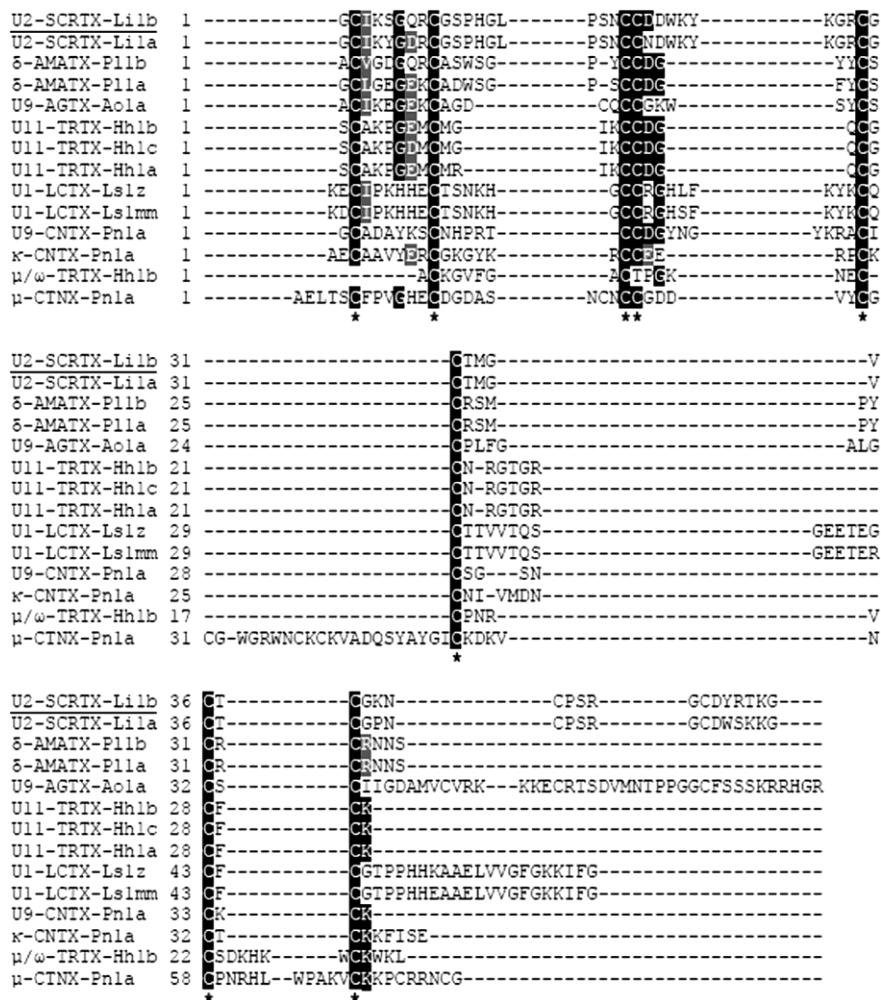


Fig. 3. Multiple sequence alignment analysis of the deduced amino acid sequence of the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide from *L. intermedia* venom glands and others ICK peptides. The alignment was generated using CLUSTAL W2 with manually modified parameters (BLOSUM matrix with cysteine value of 100 and with both fixed gap open penalty and pairwise gap open adjusted to 8). Gaps (represented by dashes) were introduced to maximize the alignment of cysteine residues (asterisks). Amino acid identities are highlighted in black and conservative substitutions are shown in gray. Sequences compared and their accession numbers: U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1a (UniProt: Q6B4T3), δ-AMATX-P11b (UniProt: P83257), δ-AMATX-P11a (UniProt: P83256), U<sub>9</sub>-AGTX-Ao1a (UniProt: Q5Y4U3), U<sub>11</sub>-TRTX-Hh1b (UniProt: B2ZBA5), U<sub>11</sub>-TRTX-Hh1c (UniProt: B2ZBA7), U<sub>11</sub>-TRTX-Hh1a (UniProt: B3FIU0), U<sub>1</sub>-LCTX-Ls1z (UniProt: B6DCN1), U<sub>1</sub>-LCTX-Ls1mm (UniProt: B6DCP5), U<sub>9</sub>-CNTX-Pn1a (UniProt: P0C2S6), κ-CNTX-Pn1a (UniProt: O76200), μ/ω-TRTX-Hh1b (UniProt: B3FIR0) and μ-CTNX-Pn1a (UniProt: P17727).

of the purified U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide by SDS-PAGE, under reducing conditions, was around 12 kDa for the monomer and 24 kDa for the dimer (Fig. 5).

### 3.5. Immunological cross-reactivity of recombinant U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b and native venom toxins of different *Loxosceles* species

Immunoblotting analysis was performed to evaluate the presence of similar epitopes to the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide in the *L. intermedia* whole venom by using the hyperimmune serum raised against the recombinant peptide. Two bands with mass of w12 kDa (monomer) and w24 kDa (dimer) were verified as expected (Fig. 6), revealing that the immunization process was successful and confirming the immunogenic characteristic of the peptide. We further

examined the antigenic cross-reactivity between the recombinant U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b and *L. intermedia* whole venom. Through immunoblotting, we verified that the hyperimmune serum raised against U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide immunodetected a native venom toxin of approximately 10 kDa in size (Fig. 6). These findings suggest that crude venom contains a peptide similar to U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b, which in turn resembles immunogenic epitopes. Additionally, hyperimmune sera against *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. gaucho* whole venom were able to detect the recombinant U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide (Fig. 7) in its both monomeric and dimeric forms.

### 4. Discussion

Initially, we aimed to clone a particular sequence of a novel ICK peptide family member from the *L. intermedia*

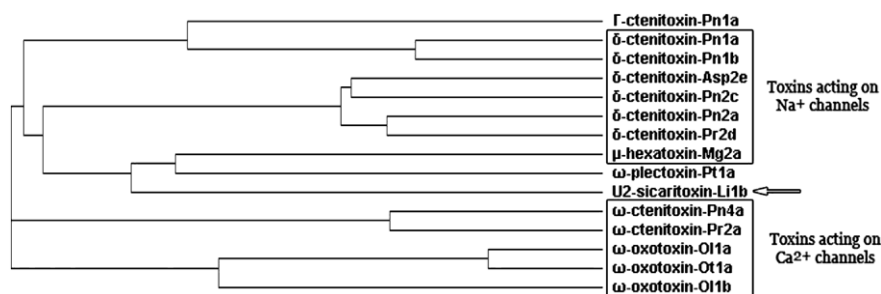


Fig. 4. Similarity cladogram comparing the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide to ICK peptides containing 10 cysteine residues with known biological activity (available from ArachnoServer 2.0 Database Server). The deduced cladogram was created based on the sequence alignment and percent identity generated by CLUSTAL W. Arrow indicates the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide. Sequences compared and their accession numbers: G-ctenitoxin-Pn1a (UniProt: P59367), d-ctenitoxin-Asp2e (UniProt: P84028), d-ctenitoxin-Pn1a (UniProt: P59368), d-ctenitoxin-Pn1b (UniProt: P84034), d-ctenitoxin-Pn2a (UniProt: P29425), d-ctenitoxin-Pn2c (UniProt: O76199), d-ctenitoxin-Pr2d (UniProt: P83904), u-ctenitoxin-Pn4a (UniProt: P81792), u-ctenitoxin-Pr2a (UniProt: P84014), u-oxotoxin-Ot1a (UniProt: POC8M0), u-oxotoxin-Ot1b (UniProt: P84756), u-oxotoxin-Ot1a (UniProt: P83288), m-hexatoxin-Mg2a (UniProt: P83559) and u-plectoxin-Pt1a (UniProt: P34079).

venom gland. A wide variety of homologous peptides have been found in several different spider venoms, such as *Phoneutria nigriventer* (Kalapothakis et al., 1998; Cardoso et al., 2003), *Chilobrachys jingzhao* (Chen et al., 2008), *Ornithoctonus huwena* (Jiang et al., 2008a) and *Agelenopsis aperta* (Skinner et al., 1989; Adams, 2004). The diversity of these similar peptides in different species' venoms can be explained by the strategy developed by the spiders throughout their evolution. To prey and defend themselves more effectively, spiders have improved their toxic arsenal over time by generating a wide range of evolutionarily selected molecules, some of which diverge in only a few amino acid residues, thus creating isoforms of a family of peptides (Tedford et al., 2004; Escoubas, 2006). The transcriptome of the *L. intermedia* venom gland (Gremski et al.,

2010) revealed that most of the transcripts encoding toxins, approximately 32%, were related to the LiTx3 peptide. In total, 257 transcripts were annotated; these transcripts were divided into groups, and seven possible isoforms were detected for this peptide family. According to Gremski et al. (2010), these seven isoforms undoubtedly explain the high expression of transcripts similar to LiTx3. The novel sequence identified here was named U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b; the lack of identification of this peptide in the transcriptome study is possibly because the transcriptome refers to

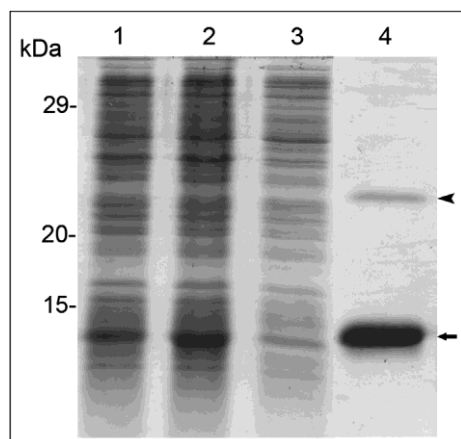


Fig. 5. Expression and purification of recombinant U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide. SDS-PAGE (18%) analysis of recombinant U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide expression stained with Coomassie blue dye, under reducing condition. Lanes 1 and 2 show *E. coli* AD494 (DE3) cells resuspended in SDS-PAGE gel loading buffer before (1) and after induction with 0.5 mM IPTG for 3.5 h (2). Lane 3 depicts the supernatant from the cell lysates obtained by freezing and thawing in extraction buffer. Lane 4 shows eluted recombinant peptide from the Ni<sup>2+</sup>-NTA beads (5 μg). The purified peptide can be seen as both monomeric (approximately 12 kDa – arrow) and dimeric (approximately 24 kDa – arrowhead) forms.

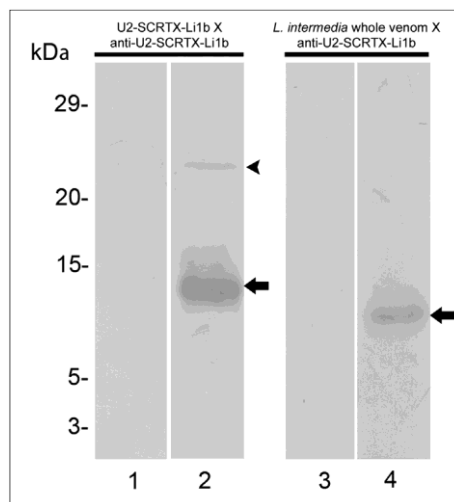


Fig. 6. Recombinant U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide immunoblotting. Proteins were separated by SDS-PAGE (18%) and transferred onto nitrocellulose membranes. Lanes 1 and 2 contain 5 μg of the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b recombinant peptide exposed to rabbit preimmune serum (1) or hyperimmune serum raised against recombinant U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide (2). Positive reaction can be seen for both monomeric (w12 kDa – arrow) and dimeric (w24 kDa – arrowhead) forms. Lanes 3 and 4 contain 15 μg of *L. intermedia* whole venom exposed to rabbit preimmune serum (3) or hyperimmune serum against recombinant U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide (4). Positive reaction can be seen only for the monomer (w12 kDa – arrow). Both sera were used at the dilution of 1:1000. Alkaline-phosphatase-conjugated anti-rabbit goat IgG was used as a secondary antibody and the reaction was developed with BCIP/NBT as substrate. Molecular mass markers are shown on the left (size in kDa).

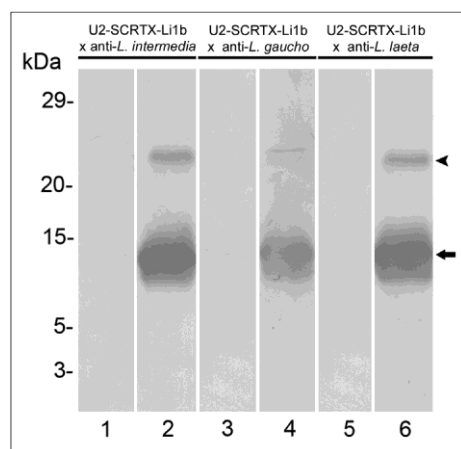


Fig. 7. Immunological cross-reactivity of hyperimmune serum raised against different *Loxosceles* spider venoms with the recombinant U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide. Samples of purified recombinant U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide (5 mg) were separated by 18% SDS-PAGE under reducing conditions and transferred onto nitrocellulose membranes. These samples were exposed to preimmune serum (1, 3 and 5), hyperimmune serum raised against *L. intermedia* whole venom (2), hyperimmune serum raised against *L. gauchoi* whole venom (4) and hyperimmune serum raised against *L. laeta* whole venom (6). Positive reaction can be seen for both monomeric (12 kDa – arrow) and dimeric (24 kDa – arrowhead) forms. Alkaline-phosphatase-conjugated anti-rabbit goat IgG was used as a secondary antibody and the reaction was developed with BCIP/NBT as substrate. Molecular mass markers are shown on the left (size in kDa).

sequences randomly selected. Furthermore, the transcripts obtained indicate that the peptide was being synthesized in the glands at the time that they were extracted.

Most of the spider peptides characterized to date were native toxins directly isolated from the venom glands. In recent years, however, molecular biology approaches have been widely used to overcome the low extraction yields of some venoms (Senff-Ribeiro et al., 2008). Moreover, the identification of the peptide from the mRNA produced by the gland cells allows us to obtain information about the manner in which the peptides are synthesized (if sequences for signal-peptide and/or propeptide are present), as well as predict the possible sites for post-translational modifications, such as C-terminal amidation (Chaim et al., 2011; Quintero-Hernández et al., 2011). The study of a specific peptide is made difficult by the small amount of venom produced by spiders of the *Loxosceles* genus. Thus, we utilized cloning and sequencing methodologies to identify and heterologously express recombinant peptide in a prokaryotic system.

To obtain the complete coding sequence for the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide, we performed 3' and 5' RACE reactions. The resulting sequences revealed that the peptide is expressed in a precursor form, which contains a signal-peptide and a propeptide segment. Accurate analysis of the coding sequence for the signal peptide showed that it contains all the segments required for its recognition and cleavage by signal peptidases: the N-terminal domain with a positively charged amino acid (MKIEL), a hydrophobic central domain (FLVVIFALAI) and lastly, a neutral but polar C-terminal domain containing the Ala-X-Ala motif

(HMATA) (von Heijne, 1990; Tuteja, 2005). Furthermore, the predicted U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b propeptide has an arginine residue preceded by a glutamic acid residue at its C-terminal end (EEVIESDIEPAER); this sequence has already been described in other spider toxins as a recognition site for enzymes specialized in the cleavage of the pro-sequence (Kozlov et al., 2005; Kozlov and Grishin, 2007). The structural organization of the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b as a prepropeptide is in accordance with the most common pattern of the spider toxins (Sollod et al., 2005; Escoubas et al., 2006). This suggests that the release of the mature peptide depends on the sequential proteolytic cleavage of the signal peptide and the propeptide sequences (Diniz et al., 1993; Sollod et al., 2005; Kozlov and Grishin, 2007).

Concomitantly with and after the removal of the pro-peptide, some post-translational modifications of the resulting mature peptide may occur. Disulfide-rich peptides from marine cone snails, generally termed conotoxins, are known to undergo a wide range of posttranslational modifications, such as O-glycosylation (Craig et al., 1998), disulfide bond formation (Kaas et al., 2010), amino acid hydroxylation (Aguilar et al., 2005), glutamic acid carboxylation (Bandyopadhyay et al., 1998), C-terminal amidation (Kang et al., 2005) and amino acid epimerization (Pisarewicz et al., 2005). On the other hand, few posttranslational modifications have been described for spider ICK peptides to date (de Castro et al., 2004; Vassilevski et al., 2009; Jungo et al., 2010). Apart from disulfide bridge formation, serine residue epimerization (Heck et al., 1994), C-terminal amidation (Skinner et al., 1989), pyroglutamic acid formation (Satake et al., 2004) and palmitoylation of a threonine residue (Bódi et al., 1995) have been reported for spider ICK peptides. Therefore, the deduced mature sequence of the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide was analyzed to predict possible modifications. Using appropriate algorithms, specific signals for N-myristoylation and C-terminal amidation were found in the mature peptide. As mentioned previously, the first glycine residue of the mature U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide is a putative site for N-myristoylation. This modification is a covalent addition of the myristate moiety (14-carbon saturated fatty acid) to the N-terminal glycine residue through a stable amide bond, catalyzed by myristoyl-CoA: protein N-myristoyltransferase (Farazi et al., 2001). The incorporation of myristate into proteins has been associated with many biological functions, such as protein-membrane interactions and subcellular targeting (Martin et al., 2011). A study reported by de Castro et al. (2004) indicated 3 putative sites for N-myristoylation in the LiTx3 peptide. This prediction was made using the PROSITE algorithm; however, none of these sites were correlated to the N-terminal glycine following proteolytic cleavage, suggesting they may have been false positives. Another possible modification to the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide is C-terminal amidation. This modification occurs in approximately 12% of the spider peptides, and it functions to protect the C-terminus from proteolytic degradation (Saez et al., 2010).

The most important and widespread feature of ICK peptides is the formation of intramolecular disulfide bonds. These structures are established between cysteine residues of the peptides, which are essential for the stabilization of



the ICK motif. The ICK motif, in turn, is composed of an antiparallel  $\beta$ -sheet associated with a molecular pseudo-knot formed by two disulfide bonds and an interconnecting backbone crossed by a third disulfide bond (Norton and Pallaghy, 1998; Craik et al., 2001).

The U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide contains 10 cysteine residues in its primary sequence, which suggests the formation of 5 intramolecular disulfide bonds. The 3 disulfide structures associated with the ICK motif in the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide were predicted using the Knoter1D tool available from the KNOTTIN Database (<http://knottin.cbs.cnrs.fr/>) (Gracy et al., 2008). The predicted pairing pattern is Cys2-Cys20, Cys9-Cys29 and Cys19-Cys38, and this pattern is in accordance with the disulfide pairing commonly found in ICK peptides, defined as C<sup>1</sup>-C<sup>4</sup>, C<sup>2</sup>-C<sup>5</sup> and C<sup>3</sup>-C<sup>6</sup>, with a consensus pattern of C<sub>1</sub>X<sub>2-7</sub> C<sub>2</sub>X<sub>3-11</sub> C<sub>3</sub>X<sub>0-7</sub> C<sub>4</sub>X<sub>1-17</sub> C<sub>5</sub>X<sub>1-19</sub> C<sub>6</sub> (where C represents the cysteine residues and X represents any amino acid residue) (Vassilevski et al., 2009; Daly and Craik, 2011). Furthermore, the cysteine residues that establish the predicted disulfide bridges of the ICK motif showed the same pairing pattern described in other spider peptides, such as m-AGTX-Aa1a from *Agelenopsis aperta* and d-AMATX-PI1a from *Pireneitega luctuosa*.

A Blast search made at the ArachnoServer 2.0 Database Server (<http://www.arachnoserver.org/blastForm.html>) (Herzig et al., 2011) showed sequences with significant similarity to the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide. As expected, the highest similarity (86%) was found with the LiTx3 peptide. Of the 53 residues that comprise these two peptides, 47 are identical. Thus, this finding suggests that the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide corresponds to a novel putative isoform of the ICK peptide family. Following reverse phase HPLC chromatography of the fraction venom with insecticidal activity obtained by de Castro et al. (2004), the chromatographic peak that corresponds to the LiTx3 peptide is symmetrical, indicating that only this peptide is present. However, though it is possible to control the stringency of this purification method, the findings do not preclude the possibility that the peak may contain other isoforms of the LiTx3 peptide that were not separated due to their high similarity. Thus, the peak representing the LiTx3 peptide may contain other isoforms, including the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide, which themselves can compose a family of related ICK peptides. In agreement with this, other *L. intermedia* toxins have been shown to have isoforms with significant similarity, and these isoforms compose families of related toxins, such as phospholipases D (da Silveira et al., 2007; Kalapothakis et al., 2007).

The ICK peptides from spider venoms exhibit neurotoxic properties, acting on ion channels and membrane receptors in the peripheral and/or central nervous system of animals (Escoubas et al., 2000; Rash and Hodgson, 2002). This neurotoxic activity is usually specific to a particular subset of target molecules. In addition, the ICK peptides may display a broad spectrum of action or may present restricted specificity to a particular phylum (de Lima et al., 2007; Vassilevski et al., 2009). Thus, ICK peptides have been shown to block or modulate voltage-gated sodium, calcium and potassium channels, act upon mechanosensitive channels, and inhibit ionotropic glutamate receptors of some insects or mammals (Windley et al., 2012; Rash and

Hodgson, 2002). Assuming that similar sequences may be associated with similar activities, we produced a cladogram of similarity between U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b and other ICK peptides with known biological functions to investigate the putative targets of this peptide. We used ICK peptides containing 10 cysteine residues because most of the cysteine residues were found at conserved positions, and the similarity is directly related to the residues placed between them. The generated cladogram showed that the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide forms a cluster with u-PLTX-Pt1a, which has been shown to act upon the voltage-gated calcium channels of *Drosophila*, and m-HXTX-Mg2a, which exerts its activity upon voltage-gated sodium channels of insects. Furthermore, the three cited peptides showed a closer relationship with other toxins that act upon voltage-gated sodium channels (d-ctenitoxins) than toxins that act upon voltage-gated calcium channels (u-ctenitoxins and u-oxotoxins); these toxins were arranged more externally. Therefore, the high similarity of the U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide to toxins that interact with sodium channels suggests that this peptide may act upon sodium channels, corroborating the results obtained by de Castro et al. (2004) with regards to the LiTx3 peptide.

The sequence encoding the propeptide and the mature peptide of U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b was subcloned into the pET-14 expression vector and transformed into *E. coli* AD949(DE3) cells to produce a recombinant form of the peptide. The *E. coli* AD949(DE3) strain is deficient in thio-redoxin reductase and is therefore more suitable for the expression of peptides rich in disulfide structures. The recombinant peptide was obtained from the soluble fraction of the lysates and this finding is consistent with other two cysteine-rich peptides from scorpion venom described in the literature (Johnson et al., 2000; Banerjee et al., 2006), which are also obtained in soluble form when expressed in the same bacterial strain. The U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b recombinant peptide was the first ICK peptide from *Loxosceles* venom to be heterologously expressed. The production of this recombinant peptide contributes to its biological characterization, as well as provides enough of this toxin to determine whether its mechanism of action in insects is similar to other families of toxins with proven insecticidal activity, such as phospholipase D enzymes (Zobbel-Thropp et al., 2012).

Additional evidence of the existence of different toxins belonging to the ICK family in other *Loxosceles* species came from the antigenic cross-reactivity of antisera raised against crude venom of *L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta* with the recombinant U<sub>2</sub>-SCRTX-Li1b peptide. The data suggest that epitopes present in this toxin are strong antigenic determinants; this cross-reactivity also corroborates the presence of ICK-like toxin members in these *Loxosceles* venoms, thus strengthening the idea that this toxin family is widespread throughout the genus.

In summary, we have identified a novel *Loxosceles* venom toxin from *L. intermedia* venom glands. We cloned, performed bioinformatic analyses, heterologously expressed, purified and immunologically studied this toxin, which was characterized as an ICK family member. Together, these results provide insights and contribute to a deeper understanding of loxoscelism. Furthermore, they

will contribute to future biotechnological applications of *Loxosceles* recombinant venom toxins, particularly to a new generation of biological insecticidal products, without the environmental side effects such as chemical pesticides.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from CAPES, CNPq, Fundação Araucária-PR and the Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná, Brazil. We are grateful to Rafael Zolt (Zoo Technician at Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil) for his help in immunization procedures and to Dr. Katia Cristina Barbaro Nogueira (Researcher at the Butantan Institute, São Paulo, Brazil) for donating anti-whole venom sera used in the immunoassays.

## Conflict of interest

A conflicting interest exists when professional judgment concerning a primary interest (such as patient's welfare or the validity of research) may be influenced by a secondary interest (such as financial gain or personal rivalry). It may arise for the authors when they have financial interest that may influence their interpretation of their results or those of others. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

## References

- Adams, M.E., 2004. Agatoxins: ion channel specific toxins from the American funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *Toxicon* 43, 509–525.
- Aguilar, M.B., López-Vera, E., Ortiz, E., Becerril, B., Possani, L.D., Olivera, B.M., Heimer de la Cotera, E.P., 2005. A novel conotoxin from *Conus delessertii* with posttranslationally modified lysine residues. *Biochemistry* 44, 11130–11136.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Appel, M.H., da Silva, R.B., Chaim, O.M., Paludo, K.S., Silva, D.T., Chaves, D.M., da Silva, P.H., Mangili, O.C., Senff-Ribeiro, A., Gremski, W., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2008. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 167–178.
- Bandyopadhyay, P.K., Colledge, C.J., Walker, C.S., Zhou, L.M., Hillyard, D.R., Olivera, B.M., 1998. Conantokin-G precursor and its role in gamma-carboxylation by a vitamin K-dependent carboxylase from a *Conus* snail. *J. Biol. Chem.* 273, 5447–5450.
- Banerjee, S., Curto, E.V., Beckman, M., Brown, G.B., Zhong, J., Krishna, N.R., 2006. Expression of functional scorpion neurotoxin LqQ-V in *E. coli*. *Peptides* 27, 49–54.
- Binford, G.J., Wells, M.A., 2003. The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogynae spiders. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 135, 25–33.
- Bódi, J., Nishio, H., Zhou, Y., Branton, W.D., Kimura, T., Sakakibara, S., 1995. Synthesis of an O-palmitoylated 44-residue peptide amide (PLTX II) blocking presynaptic calcium channels in *Drosophila*. *Pept. Res.* 8, 228–235.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Branton, W.D., Koltun, L., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 1987. Neurotoxins from *Plectreurys* spider venom are potent presynaptic blockers in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 7, 4195–4200.
- Cardoso, F.C., Pacifico, L.G., Carvalho, D.C., Victoria, J.M., Neves, A.L., Chaves-Olortegui, C., Gomez, M.V., Kalapothakis, E., 2003. Molecular cloning and characterization of Phoneutria nigriventer toxins active on calcium channels. *Toxicon* 41, 755–763.
- Chaim, O.M., Sade, Y.B., da Silva, R.B., Toma, L., Kalapothakis, E., Chaves-Olortegui, C., Mangili, O.C., Gremski, W., von Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2006. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211, 64–77.
- Chaim, O.M., Trevisan-Silva, D., Chaves-Moreira, D., Wille, A.C.M., Ferrer, V.P., Matsubara, F.H., Mangili, O.C., da Silva, R.B., Gremski, L.H., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2011. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes. *Toxins (Basel)* 3, 309–344.
- Chen, J., Deng, M., He, Q., Meng, E., Jiang, L., Liao, Z., Rong, M., Liang, S., 2008. Molecular diversity and evolution of cystine knot toxins of the tarantula *Chilobrachys jingzhao*. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2431–2444.
- Corzo, G., Escoubas, P., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Kristensen, C.P., Nakajima, T., 2000. Isolation, synthesis and pharmacological characterization of delta-palutoxins IT, novel insecticidal toxins from the spider *Paracaelotes luctuosus* (Amaurobiidae). *Eur. J. Biochem.* 267, 5783–5795.
- Corzo, G., Gilles, N., Satake, H., Villegas, E., Dai, L., Nakajima, T., Haupt, J., 2003. Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider *Macrothele gigas* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel. *FEBS Lett.* 547, 43–50.
- Craig, A.G., Zafaralla, G., Cruz, L.J., Santos, A.D., Hillyard, D.R., Dykert, J., Rivier, J.E., Gray, W.R., Imperial, J., Delacruz, R.G., Sporning, R.G., Terlau, H., West, P.J., Yoshikami, D., Olivera, B.M., 1998. An O-glycosylated neuroexcitatory *Conus* peptide. *Biochemistry* 37, 16019–16025.
- Craik, D.J., Daly, N.L., Waine, C., 2001. The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. *Toxicon* 39, 43–60.
- da Silva, P.H., da Silva, R.B., Appel, M.H., Mangili, O.C., Gremski, W., Veiga, S.S., 2004. Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon* 44, 693–709.
- da Silva, R.B., dos Santos Filho, J.F., Mangili, O.C., Veiga, S.S., Gremski, W., Nader, H.B., von Dietrich, C.P., 2002. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. *Toxicon* 40, 815–822.
- da Silva, R.B., Pigozzo, R.B., Chaim, O.M., Appel, M.H., Dreyfuss, J.L., Toma, L., Mangili, O.C., Gremski, W., Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2006. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. *Biochimie* 88, 1241–1253.
- da Silva, R.B., Pigozzo, R.B., Chaim, O.M., Appel, M.H., Silva, D.T., Dreyfuss, J.L., Toma, L., Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., Gremski, W., 2007. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. *Biochimie* 89, 289–300.
- Daly, N.L., Craik, D.J., 2011. Bioactive cystine knot proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 362–368.
- de Castro, S.C., Silvestre, F.G., Araújo, S.C., Yazbeck, G.M., Mangili, O.C., Cruz, I., Chaves-Olortegui, C., Kalapothakis, E., 2004. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon* 44, 273–280.
- de Lima, M.E., Figueiredo, S.G., Pimenta, A.M., Santos, D.M., Borges, M.H., Cordeiro, M.N., Richardson, M., Oliveira, L.C., Stankiewicz, M., Pelhate, M., 2007. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146, 264–279.
- de Oliveira, K.C., Gonçalves de Andrade, R.M., Piazza, R.M., Ferreira Jr., J.M., van den Berg, C.W., Tambourgi, D.V., 2005. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. *Toxicon* 45, 421–429.
- Diniz, M.R.V., Paine, M.J.I., Diniz, C.R., Theakston, R.D.G., Crampton, J.M., 1993. Sequence of the cDNA coding for the lethal neurotoxin Tx1 from the Brazilian “armed” spider *Phoneutria nigriventer* predicts the synthesis and processing of a preprotoxin. *J. Biol. Chem.* 268, 15340–15342.
- dos Santos, V.L., Franco, C.R., Viggiano, R.L., da Silva, R.B., Cantão, M.P., Mangili, O.C., Veiga, S.S., Gremski, W., 2000. Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). *Toxicon* 38, 265–285.
- Duterte, S., Lewis, R.J., 2010. Use of venom peptides to probe ion channel structure and function. *J. Biol. Chem.* 285, 13315–13320.
- Escoubas, P., 2006. Molecular diversification in spider venoms: a web of combinatorial peptide libraries. *Mol. Divers.* 10, 545–554.
- Escoubas, P., Bosmans, F., 2007. Spider peptide toxins as leads for drug development. *Expert Opin. Drug Discov.* 2, 823–835.
- Escoubas, P., Diochot, S., Corzo, G., 2000. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie* 82, 893–907.
- Escoubas, P., Quinton, L., Nicholson, G.M., 2008. Venomics: unraveling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 43, 279–295.

- Escoubas, P., Sollod, B., King, G.F., 2006. Venom landscapes: mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. *Toxicon* 47, 650–663.
- Farazi, T.A., Waksman, G., Gordon, J.I., 2001. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J. Biol. Chem.* 276, 39501–39504.
- Feitosa, L., Gremski, W., Veiga, S.S., Elias, M.C., Graner, E., Mangili, O.C., Brentani, R.R., 1998. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* 36, 1039–1051.
- Gracy, J., Le-Nguyen, D., Gelly, J.C., Kaas, Q., Heitz, A., 2008. KNOTTIN: the knottin or inhibitor cystine knot scaffold in 2007. *Nucleic Acids Res.* 36, D314–D319.
- Gremski, L.H., da Silveira, R.B., Chaim, O.M., Probst, C.M., Ferrer, V.P., Nowatzki, J., Weinschutz, H.C., Madeira, H.M., Gremski, W., Nader, H.B., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2010. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Mol. Biosyst.* 6, 2403–2416.
- Grishin, E., 1999. Polypeptide neurotoxins from spider venoms. *Eur. J. Biochem.* 264, 276–280.
- Harlow, E., Lane, D., 1988. Using Antibodies: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Heck, S.D., Kelbaugh, P.R., Kelly, M.E., Thadeio, P.F., Saccomano, N.A., Stroh, J.G., Volkmann, R.A., 1994. Disulfide bond assignment of omega-agatoxins IVB and IVC: discovery of a D-serine residue in omega-agatoxin IVB. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 10426–10436.
- Herzig, V., Wood, D.L.A., Newell, F., Chaumeil, P.A., Kaas, Q., Binford, G.J., Nicholson, G.M., Gorse, D., King, G.F., 2011. Arachnoserver 2.0, an updated online resource for spider toxin sequences and structures. *Nucleic Acids Res.* 39, D653–D657.
- Horita, S., Matsushita, N., Kawachi, T., Ayabe, R., Miyashita, M., Miyakawa, T., Nakagawa, Y., Nagata, K., Miyagawa, H., Tanokura, M., 2011. Solution structure of a short-chain insecticidal toxin LaIT1 from the venom of scorpion *Liocheles australasiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 738–744.
- Jiang, L.P., Chen, J.J., Peng, L., Zhang, Y.Q., Xiong, X., Liang, S.P., 2008a. Genomic organization and cloning of novel genes encoding toxin-like peptides of three superfamilies from the spider *Ornithoctonus huwena*. *Peptides* 29, 1679–1684.
- Jiang, L., Peng, L., Chen, J., Zhang, Y., Xiong, X., Liang, S., 2008b. Molecular diversification based on analysis of expressed sequence tags from the venom glands of the Chinese bird spider *Ornithoctonus huwena*. *Toxicon* 51, 1479–1489.
- Johnson, J.H., Bloomquist, J.R., Krapcho, K.J., Kral Jr., R.M., Trovato, R., Eppler, K.G., Morgan, T.K., DelMar, E.G., 1998. Novel insecticidal peptides from *Tegenaria agrestis* spider venom may have a direct effect on the insect central nervous system. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 38, 19–31.
- Johnson, T.M., Quick, M.W., Sakai, T.T., Krishna, N.R., 2000. Expression of functional recombinant scorpion beta-neurotoxin Csx II in *E. coli*. *Peptides* 21, 767–772.
- Jungo, F., Estreicher, A., Bairoch, A., Bougueleret, L., Xenarios, I., 2010. Animal toxins: how is complexity represented in databases? *Toxins (Basel)* 2, 262–282.
- Kaas, Q., Westermann, J.C., Craik, D.J., 2010. Conopeptide characterization and classifications: an analysis using ConoServer. *Toxicon* 55, 1491–1509.
- Kalopothakis, E., Penaforte, C.L., Beirão, P.S.L., Romano-Silva, M.A., Cruz, J.S., Prado, M.A.M., Guimarães, P.E.M., Gomez, M.V., Prado, V.F., 1998. Cloning of cDNAs encoding neurotoxic peptides from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* 36, 1843–1850.
- Kalopothakis, E., Chatzaki, M., Gonçalves-Dornelas, H., Castro, C.S., Silvestre, F.G., Laborne, F.V., de Moura, J.F., Veiga, S.S., Chávez-Olortegui, C., Granier, C., Barbaro, K.C., 2007. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. *Toxicon* 50, 938–946.
- Kang, T.S., Vivekanandan, S., Jois, S.D., Kini, R.M., 2005. Effect of C-terminal amidation on folding and disulfide-pairing of alphaconotoxin Iml. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44, 6333–6337.
- King, G.F., Gentz, M.C., Escoubas, P., Nicholson, G.M., 2008. A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon* 52, 264–276.
- King, G.F., Hardy, M.C., 2013. Spider-venom peptides: structure, pharmacology, and potential for control of insect pests. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 475–496.
- Kozlov, S., Malyavka, A., McCutchen, B., Lu, A., Schepers, E., Herrmann, R., Grishin, E., 2005. A novel strategy for the identification of toxin like structures in spider venom. *Proteins* 59, 131–140.
- Kozlov, S.A., Grishin, E.V., 2007. The universal algorithm of maturation for secretory and excretory protein precursors. *Toxicon* 49, 721–726.
- Kushmerick, C., Kalopothakis, E., Beirão, P.S., Penaforte, C.L., Prado, V.F., Cruz, J.S., Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., Gomez, M.V., Romano-Silva, M.A., Prado, M.A., 1999. Phoneutria nigriventer toxin Tx3-1 blocks A-type K<sup>P</sup> currents controlling Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency in GH3 cells. *J. Neurochem.* 72, 1472–1481.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lewis, R.J., Garcia, M.L., 2003. Therapeutic potential of venom peptides. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 790–802.
- Martin, D.D.O., Beauchamp, E., Berthiaume, L.G., 2011. Post-translational myristoylation: fat matters in cellular life and death. *Biochimie* 93, 18–31.
- Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Eisenhaber, F., 2002. N-terminal N-myristoylation of proteins: refinement of the sequence motif and its taxon-specific differences. *J. Mol. Biol.* 317, 523–540.
- Mosbah, A., Kharrat, R., Fajloun, Z., Renisio, J.G., Blanc, E., Sabatier, J.M., El Ayeb, M., Darbon, H., 2000. A new fold in the scorpion toxin family, associated with an activity on a ryanodine-sensitive calcium channel. *Proteins* 40, 436–442.
- Norton, R.S., Pallaghy, P.K., 1998. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon* 36, 1573–1583.
- Oliveira, B.M., Cruz, L.J., 2001. Conotoxins, in retrospect. *Toxicon* 39, 7–14.
- Oliveira, B.M., Rivier, J., Clark, C., Ramilo, C.A., Corpuz, G.P., Abogadie, F.C., Mena, E.E., Woodward, S.R., Hillyard, D.R., Cruz, L.J., 1990. Diversity of Conus neuropeptides. *Science* 249, 257–263.
- Pallaghy, P.K., Nielsen, K.J., Craik, D.J., Norton, R.S., 1994. A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded beta-sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Sci.* 3, 1833–1839.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8, 785–786.
- Pisarewicz, K., Mora, D., Pflueger, F.C., Fields, G.B., Mari, F., 2005. Polypeptide chains containing D-gamma-hydroxyvaline. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 6207–6215.
- Quintero-Hernández, V., Ortiz, E., Rendón-Anaya, M., Schwartz, E.F., Becerril, B., Corzo, G., Possani, L.D., 2011. Scorpion and spider venom peptides: gene cloning and peptide expression. *Toxicon* 58, 644–663.
- Rash, L.D., Hodgson, W.C., 2002. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* 40, 225–254.
- Sade, Y.B., Bóia-Ferreira, M., Gremski, L.H., Da Silveira, R.B., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2012. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 170–177.
- Saez, N.J., Senff, S., Jensen, J.E., Er, S.Y., Herzig, V., Rash, L.D., King, G.F., 2010. Spider-venom peptides as therapeutics. *Toxins (Basel)* 2, 2851–2871.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sams, H.H., Dunnick, C.A., Smith, M.L., King, L.E., 2001. Necrotic arachnidism. *J. Am. Acad. Dermatol.* 44, 561–573.
- Satake, H., Villegas, E., Oshiro, N., Terada, K., Shinada, T., Corzo, G., 2004. Rapid and efficient identification of cysteine-rich peptides by random screening of a venom gland cDNA library from the hexathelid spider *Macrochele gigas*. *Toxicon* 44, 149–156.
- Senff-Ribeiro, A., Henrique da Silva, P., Chaim, O.M., Gremski, L.H., Paludo, K.S., da Silveira, R.B., Gremski, W., Mangili, O.C., Veiga, S.S., 2008. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. *Biotechnol. Adv.* 26, 210–218.
- Skinner, W.S., Adams, M.E., Quistad, G.B., Kataoka, H., Cesarin, B.J., Enderlin, F.E., Schooley, D.A., 1989. Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *J. Biol. Chem.* 264, 2150–2155.
- Sollod, B.L., Wilson, D., Zhaxybayeva, O., Gogarten, J.P., Drinkwater, R., King, G.F., 2005. Were arachnids the first to use combinatorial peptide libraries? *Peptides* 26, 131–139.
- Stapleton, A., Blankenship, D.T., Ackermann, B.L., Chen, T.M., Gorder, G.W., Manley, G.D., Palfreyman, M.G., Coutant, J.E., Cardin, A.D., 1990. Curatoxins. Neurotoxic insecticidal polypeptides isolated from the funnel-web spider *Hololena curta*. *J. Biol. Chem.* 265, 2054–2059.
- Tedford, H.W., Gilles, N., Ménez, A., Doering, C.J., Zamponi, G.W., King, G.F., 2004. Scanning mutagenesis of omega-atracotoxin-Hv1a reveals a spatially restricted epitope that confers selective activity against insect calcium channels. *J. Biol. Chem.* 279, 44133–44140.
- Trevisan-Silva, D., Gremski, L.H., Chaim, O.M., da Silveira, R.B., Meissner, G.O., Mangili, O.C., Barbaro, K.C., Gremski, W., Veiga, S.S., Senff-Ribeiro, A., 2010. Astacin-like metalloproteinases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). *Biochimie* 92, 21–32.

- Tuteja, R., 2005. Type I signal peptidase: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 441, 107–111.
- Vassilevski, A.A., Kozlov, S.A., Grishin, E.V., 2009. Molecular diversity of spider venom. *Biochem. (Mosc.)* 74, 1505–1534.
- Veiga, S.S., Feitosa, L., dos Santos, V.L., de Souza, G.A., Ribeiro, A.S., Mangili, O.C., Porcionatto, M.A., Nader, H.B., Dietrich, C.P., Brentani, R.R., Gremski, W., 2000. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. *Histochem. J.* 32, 397–408.
- von Heijne, G., 1990. The signal peptide. *J. Membr. Biol.* 115, 195–201.
- Windley, M.J., Herzig, V., Dziemborowicz, S.A., Hardy, M.C., King, G.F., Nicholson, G.M., 2012. Spider-venom peptides as bioinsecticides. *Toxins (Basel)* 4, 191–227.
- Zhang, Y., Chen, J., Tang, X., Wang, F., Jiang, L., Xiong, X., Wang, M., Rong, M., Liu, Z., Liang, S., 2010. Transcriptome analysis of the venom glands of the Chinese wolf spider *Lycosa singoriensis*. *Zoology (Jena)* 113, 10–18.
- Zobel-Thropp, P.A., Kerins, A.E., Binford, G.J., 2012. Sphingomyelinase D in sicariid spider venom is a potent insecticidal toxin. *Toxicon* 60, 265–271.





## Review

## Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins



Luiza Helena Gremski<sup>a,b</sup>, Dilza Trevisan-Silva<sup>a</sup>, Valéria Pereira Ferrer<sup>a</sup>,  
Fernando Hitomi Matsubara<sup>a</sup>, Gabriel Otto Meissner<sup>a</sup>,  
Ana Carolina Martins Wille<sup>a,c</sup>, Larissa Vuitika<sup>a</sup>, Camila Dias-Lopes<sup>d</sup>,  
Anwar Ullah<sup>e</sup>, Fábio Rogério de Moraes<sup>e</sup>, Carlos Chávez-Olórtegui<sup>d</sup>,  
Katia Cristina Barbaro<sup>f</sup>, Mario Tyago Murakami<sup>g</sup>,  
Raghuvir Krishnaswamy Arni<sup>e</sup>, Andrea Senff-Ribeiro<sup>a</sup>, Olga Meiri Chaim<sup>a</sup>,  
Silvio Sanches Veiga<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>e</sup> Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

<sup>f</sup> Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

<sup>g</sup> Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo, Brazil

### article info

#### Article history:

Received 6 August 2013

Received in revised form 19 December 2013

Accepted 27 February 2014

Available online 11 March 2014

#### Keywords:

Brown spider

Loxosceles

Venom

Toxins

Loxoscelism

Dermonecrosis

### abstract

The *Loxosceles* genus spiders (the brown spiders) are encountered in all the continents, and the clinical manifestations following spider bites include skin necrosis with gravitational lesion spreading and occasional systemic manifestations, such as intravascular hemolysis, thrombocytopenia and acute renal failure. Brown spider venoms are complex mixtures of toxins especially enriched in three molecular families: the phospholipases D, astacin-like metalloproteases and Inhibitor Cystine Knot (ICK) peptides. Other toxins with low level of expression also present in the venom include the serine proteases, serine protease inhibitors, hyaluronidases, allergen factors and translationally controlled tumor protein (TCTP). The mechanisms by which the *Loxosceles* venoms act and exert their noxious effects are not fully understood. Except for the brown spider venom phospholipase D, which causes dermonecrosis, hemolysis, thrombocytopenia and renal failure, the pathological activities of the other venom toxins remain unclear. The objective of the present review is to provide insights into the brown spider venoms and loxoscelism based on recent results. These insights include the biology of brown spiders, the clinical features of loxoscelism and the diagnosis and therapy of brown spider bites. Regarding the brown spider venom, this review includes a description of the novel toxins revealed by molecular biology and proteomics techniques, the data regarding three-dimensional toxin structures, and the mechanism of action of these molecules. Finally, the biotechnological applications of the

\* Corresponding author. Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Jardim das Américas, 81531-990 Curitiba, Paraná, Brazil. Fax: +55 41 3266 2042.

E-mail address: [veigass@ufpr.br](mailto:veigass@ufpr.br) (S.S. Veiga).

venom components, especially for those toxins reported as recombinant molecules, and the challenges for future study are discussed.

2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Spider bites of the genus *Loxosceles* have been associated with clinical manifestations characterized by dermonecrosis with gravitational spreading near the lesion site and, to a lesser extent, with systemic toxicity, such as the hematological disturbances of intravascular hemolysis, thrombocytopenia, disseminated intravascular coagulation and acute renal failure. The spiders of the genus *Loxosceles* are encountered in all continents and different species have been reported in North America, Central America, South America, Europe, Africa, the Middle East, Oceania and Asia. Five species (*Loxosceles rufescens*, *Loxosceles laeta*, *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* and *Loxosceles reclusa*) are responsible for most cases of human envenomation by the *Loxosceles* genus, and the pathology and clinical features of these spider bites are termed loxoscelism. Nevertheless, sporadic accidents caused by others *Loxosceles* species (*Loxosceles deserta*, *Loxosceles arizonica*, *Loxosceles anomala*, *Loxosceles similis*, for instance) have been described around the world (da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Swanson and Vetter, 2006; Bucarechi et al., 2010; Isbister and Fan, 2011; Chatzaki et al., 2012).

The venom of the brown spider is a colorless and crystalline liquid, formed by a complex mixture of toxins enriched in proteins, glycoproteins and low molecular mass peptides with a predominance of toxins in the range of 5–40 kDa (Sams et al., 2001; da Silveira et al., 2002; da Silva et al., 2004; Machado et al., 2005; Swanson and Vetter, 2006). Previously published data have described highly expressed molecules, such as phospholipases D, astacin-like metalloproteases and low molecular mass insecticidal peptides (characterized as ICK peptides) (da Silva et al., 2004; de Castro et al., 2004; da Silveira et al., 2007a; Gremski et al., 2010; Matsubara et al., 2013). Together, these three toxin classes comprise the majority of the toxin-encoding transcripts in the venom gland of *L. intermedia* (approximately 95%) (Gremski et al., 2010). Other toxins with low level of expression, such as hyaluronidase, serine proteases, serine protease inhibitors, venom allergens and a TCTP family member, have been identified in the venom (de Castro et al., 2004; Barbaro et al., 2005; Gremski et al., 2010; Sade et al., 2012; Ferrer et al., 2013).

Regarding the hemolymph of brown spiders, no current description of its molecular composition, biological activities or even physical properties exists. Nevertheless, the potential of the hemolymph to contain natural inhibitors, antifungals or antibiotics is significant and is based on the environment in which the spiders live and the toxins that the brown spiders produce.

In recent years, knowledge of brown spider venoms has advanced significantly through the use of molecular biology techniques. The transcriptomes of the *L. laeta* and *L. intermedia* venom glands were analyzed for the first time,

and this analysis confirmed the complexity of *Loxosceles* venoms (Fernandes-Pedrosa et al., 2008; Gremski et al., 2010). Additionally, by using recombinant DNA technology, heterologous toxins have been expressed and purified. These advances obtained with the recombinant *Loxosceles* venom toxins helped to overcome the obstacles to studying spider toxins, such as the low venom volumes and the difficulty in the purification of native toxins from crude venom. Moreover, these recent advances have enabled researchers to utilize cell biology, biochemistry, immunology, pharmacology and crystallography to clarify the general characteristics of *Loxosceles* toxins.

By using proteomics approaches, such as two-dimensional gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing and mass spectrometry, the venoms of *L. gaucho* and *L. intermedia* have been investigated (Machado et al., 2005; dos Santos et al., 2009).

Recent advances in protein purification techniques, the application of different models for the synthesis of recombinant toxins, the modeling of domains, the knowledge of the binding or catalytic sites of the toxins of interest and, finally, the availability of the varied cellular and animal models for assessing the products obtained have created possibilities for a broad putative biotechnological use of brown spider venom toxins as important tools (Senff-Ribeiro et al., 2008; Gremski et al., 2010; Chaim et al., 2011a; Wille et al., 2013).

This review focuses on the most recent literature examining brown spider venom and loxoscelism. It discusses the molecular biology techniques used for the characterization of the molecules in brown spider venom, such as transcriptome projects, as well as the production and evaluation of recombinant toxins. Furthermore, it also describes the recent advances in the molecular complexity of venom toxins, and finally, it lists the putative biotechnological applications of several brown spider venom components.

## 2. Biology of brown spiders

The spiders of the *Loxosceles* genus belong to the Sicariidae family, sub-order Labidognatha, order Araneida, class Arachnida, and phylum Arthropoda (Platnick, 2013) (Fig. 1). In North America, this genus is popularly referred as recluse spiders, brown recluse spiders and violin spiders (fiddle back), due to a characteristic violin shape on the dorsal surface of the spider's cephalothorax. In South America, they are called brown spiders (da Silva et al., 2004; Vetter, 2008). The name *Loxosceles* means "slanted legs" because of the way the spider positions its legs at rest (Vetter, 2008). Approximately 130 species of the *Loxosceles* genus have been described and are extensively distributed worldwide (Platnick, 2013). The majority of these spiders are present in the Americas, West Indies and Africa, and some species



Fig. 1. Adult brown spiders. *Loxosceles gaucho* female (A) and male (E); *Loxosceles intermedia* female (B) and male (F); *Loxosceles laeta* female (C) and male (G). An adult brown spider and an ootheca (arrow) (D). The classic violin pattern (arrow) appears on the dorsal surface of the cephalothorax from *Loxosceles gaucho* adult spider (H). Photos are courtesy of Denise Maria Candido from the Instituto Butantan, São Paulo, Brazil. The colored figure refers to the on-line image. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

have been described in Mediterranean Europe and China (Binford et al., 2008). There is evidence that *Loxosceles* and *Sicarius* originated from a common sicariid ancestor on Western Gondwana, before the separation of the African and South American continents (Binford et al., 2008). Currently, in Brazil, 12 known species of spiders of this genus are present (Bertani et al., 2010; Gonçalves-de-Andrade et al., 2012).

They are small spiders, varying from 1 to 5 cm in length, including the legs. They exhibit sexual dimorphism, with females usually larger than males. The males have palps with modified tarsi with an additional structure specialized for the transfer of sperm, the spermatophore (Gilbert and Raunio, 1997). The spiders of the *Loxosceles* genus possess six eyes arranged in non-touching pairs and a U-shaped pattern. This eye positioning has been described as the best means to identify brown spiders (da Silva et al., 2004; Appel et al., 2005; Vetter, 2008; Chaim et al., 2011a).

Brown spiders can survive several months without food or water and can withstand temperatures ranging from 8 to 43 °C (da Silva et al., 2004). The reported longevity for the *L. intermedia* is 1176–478 days for females and 557–87 days for males (Fischer and Vasconcellos-Neto, 2005a). They construct irregular webs that resemble cotton threads (da Silva et al., 2004). Other studies indicated the preference for dead prey (Sandidge, 2004; Fischer and Vasconcellos-Neto, 2005b), although this preference depends on the size and freshness of the live or dead prey (Cramer, 2008; Vetter, 2011a).

The hemolymph of arachnids and insects has many important functions. It participates in homeostatic processes (Ruppert et al., 2004) in the transport of hormones, enzymes and nutrients, as well as metabolic residues for excretion; in the animal's protection; and in the storage of water and lipids (Araújo, 2009).

Although spiders are arachnids and not insects, insecticides are effective in reducing the brown spider population. Many chemicals may not kill the spider but will disrupt the nervous system and other bodily functions (Sandidge and Hopwood, 2005). Lindane and chlordane are insecticides identified as effective, lethal substances to *Loxosceles* spiders, however, these products have carcinogenic effects and, therefore, are no longer used for spider population control (Navarro-Silva et al., 2010). The use of pyrethroids for spider population control has also been evaluated in the field and the laboratory by testing the susceptibility of *L. intermedia* specimens to this class of insecticides. In laboratory tests, microencapsulated lambda-cyhalothrin (ME lambda-cyhalothrin) demonstrated the highest toxicity. A field test confirmed these laboratory results, and the authors concluded that ME lambda-cyhalothrin would be useful in integrated pest management programs for *L. intermedia* (Navarro-Silva et al., 2010). Sandidge (2004) investigated the potential to biologically control *L. reclusa* using the natural arachnid fauna found in most homes. Three common web-building cosmopolitan spiders, *Achaearanea tepidariorum*, *Steatoda triangulosa* and *Pholcus phalangioides*, readily feed on

cleaner use in the home has been considered as an effective tool for the integrated management of *L. intermedia* and other spider populations (Ramires et al., 2007). Furthermore, tolerance to the presence of geckos at home, which are considered a natural predator of spiders, has also been considered a promising tool (Ramires and Fraguas, 2004).

### 3. Clinical features of loxoscelism

The number of loxoscelism cases worldwide is likely underestimated because most cases are not reported (da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Dyachenko et al., 2006; Abdulkader et al., 2008; Makris et al., 2009; Pippirs et al., 2009; Pernet et al., 2010; Bajin et al., 2011; Lane et al., 2011; Sanchez-Olivas et al., 2011; Huguet et al., 2012; Ribuffo et al., 2012). Notwithstanding their prevalence as an underreported condition, *Loxosceles* spider bites are considered a public health problem in countries such as Brazil, Chile and Peru because of their frequency and associated morbidity (da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Zambrano et al., 2005; Swanson and Vetter, 2006; de Souza et al., 2008; Manríquez and Silva, 2009; Vetter, 2009; Isbister and Fan, 2011; Malaque et al., 2011). As shown in Table 1, since 2001, Brazil has experienced a progressive increase in the number of reported loxoscelism cases. It is currently estimated that approximately 8000 spider bites occur annually, and most of them are reported in the southeastern and southern urban areas of Brazil. The increase in loxoscelism reports in recent years could be a consequence of an ecological imbalance caused by the deforestation and extinction of natural predators, climate change, and pest management practices, which results in the adaptation of spiders to the urban environment (da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Swanson and Vetter, 2006; Isbister and Fan, 2011; Saupe et al., 2011; Vetter, 2011a).

Spiders displaced from their natural environment end up inhabiting the breaches, fissures and orifices of human houses. They also seek shelter in storage boxes or in the corners of cupboards and drawers. Accordingly, they can be found inside clothes, towels and bedclothes. As a result,

Table 1  
Notifications of *Loxosceles* accidents occurred in Brazil from 2001 to 2012.

Year	Notifications	Deaths	% (deaths/notifications)
2012	7528	2	0.03
2011	8033	6	0.08
2010	7885	2	0.03
2009	8472	2	0.02
2008	7977	3	0.04
2007	9277	12	0.13
2006	7619	5	0.07
2005	7702	3	0.04
2004	8207	1	0.01
2003	7806	3	0.04
2002	6303	3	0.05
2001	5011	5	0.01

control of these populations; most importantly, they are relatively harmless to humans. Additionally, vacuum



most spider bites occur when the victims press the spider against their body; for that reason, victims are most frequently bitten on the trunk, thigh and arm. The fangs of the *Loxosceles* spider are small, and the venom is likely injected by intradermal injection. The spider bites mainly occur during the warmest seasons (spring and summer) (da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Isbister and Fan, 2011; Vetter, 2011b; Rader et al., 2012).

*Loxosceles* bites lead to a mild stinging with clinical signs and symptoms developing only several hours afterward; consequently, the bite is barely noticed, and the spider is rarely captured (w10% of cases) at the time of the bite. Therefore, the diagnosis of loxoscelism is usually presumptive and based on the clinical and epidemiological features presented by the patient at the time of hospital admission, which usually occurs from 12 to 24 h after the bite, when the skin damage is more prominent (da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Hubbard and James, 2011; Isbister and Fan, 2011). The classical clinical symptoms caused by *Loxosceles* spider bites are characterized by an intense inflammatory reaction at the bite site followed by local necrosis and can be classified as cutaneous loxoscelism (more than 70% of the cases). The cutaneous loxoscelism is characterized by initial local symptoms, such as burning-stinging, undefined pain, and edema. Most of the time, the patients seek help only several hours after the bite when the signs and symptoms become more severe, such as burning pain, edema, blister formation, erythema, ecchymosis, and paleness (called marble plaques) (Fig. 2 A–C). After several days, a necrotic area forms, which is followed by an ulcer of variable size that scabs over and frequently leaves a sharply defined area surrounded by the raised edges of healthy skin (Fig. 2 D). These necrotic wounds can take several weeks to heal. Other symptoms, such as a scarlatiniform or morbilliform rash, malaise, nausea, vomiting, a low-grade fever or headache, can also occur (da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Isbister and Fan, 2011).

Apart from the venom, many other factors associated with the spider (intra- and inter specific variations, the developmental stage and the amount of venom injected) or the patient (the adipose tissue at the bite site, the amount of tissue sphingomyelin, the patient's age and the individual genetic variance) can influence the severity of the bite (da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; de Oliveira et al., 2005; Tambourgi et al., 2010). For instance, terminal circulation areas or adipose tissue are more sensitive to the venom's action, developing necrosis and severe tissue injury, which may require corrective plastic surgery. Despite the severity of the injury caused by *Loxosceles* venom at the bite site, the development of secondary infections is rare (Hogan et al., 2004; Abdulkader et al., 2008; Isbister and Fan, 2011; Malaque et al., 2011; Huguet et al., 2012; Ribuffo et al., 2012).

Severe cases can be classified as viscerocutaneous or systemic loxoscelism and range from 0.7% to 27% varying geographically or by the *Loxosceles* species responsible for the spider bite (Barbaro and Cardoso, 2003; Hogan et al., 2004; Abdulkader et al., 2008; Isbister and Fan, 2011). For instance, some data have demonstrated that viscerocutaneous loxoscelism has a higher prevalence in several

countries, such as Chile (15.7%) and Peru (27.2%), as well as in Santa Catarina state/Brazil (13.1%), where *L. laeta* is found (da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004).

Systemic loxoscelism is characterized by hematuria, hemoglobinuria, jaundice, fever, nausea and disseminated intravascular coagulation (da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Isbister and Fan, 2011). Recently, Malaque et al. (2011) found that mild hemolysis is frequent in patients bitten by *L. gaucho* (present in one-third of the cases examined, including those classified as cutaneous loxoscelism). However, acute kidney injury occurred exclusively in patients with extensive hemolysis. Oliguria and dark urine, which can suggest extensive intravascular hemolysis or rhabdomyolysis, can result in acute renal failure, which is the primary cause of death associated with loxoscelism. Nevertheless, the level of mortality (Table 1) caused by *Loxosceles* spider bites is low (França et al., 2002; da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Abdulkader et al., 2008; de Souza et al., 2008; Isbister and Fan, 2011; Malaque et al., 2011). Although large case studies report systemic loxoscelism across all age groups, most cases are reported in children (Schenone et al., 2001; Hostetler et al., 2003; da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Elbahlawan et al., 2005; Hubbard and James, 2011; Isbister and Fan, 2011; Taskesen et al., 2011; Rosen et al., 2012).

#### 4. Diagnosis and therapy

No consensus treatment for loxoscelism exists, and different therapies are used in different parts of the world. In some countries, the therapy is based on dapsone, antihistamines, analgesics and corticosteroids. However, other treatments, such as the use of steroids, surgical excision, hyperbaric oxygen therapy, and negative pressure wound therapy (vacuum-assisted closure), have been employed in an attempt to remedy the effects of envenomation (da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Swanson and Vetter, 2005; Tutrone et al., 2005; Swanson and Vetter, 2006; Abdulkader et al., 2008; Vetter and Isbister, 2008; Wong et al., 2009; Tambourgi et al., 2010; Andersen et al., 2011; Hubbard and James, 2011; Isbister and Fan, 2011). Another treatment option is the administration of antivenoms against the *Loxosceles* venoms, which are available in Brazil, Argentina and Mexico [horse-derived F(ab)<sup>2</sup> antivenoms] and Peru (whole IgG antivenom) (Isbister et al., 2003; da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Pauli et al., 2009; Isbister and Fan, 2011). The antivenom is administered intravenously, and the number of vials used varies according to the clinical severity of the envenomation (cutaneous loxoscelism) present at hospital admission and is administered to all patients with viscerocutaneous loxoscelism (Brasil, 2001).

The delay in seeking medical care by patients (approximately 24 h after the spider bite) can further contribute to the extension of local tissue damage at the bite site because the cutaneous necrosis and systemic clinical symptoms induced by the venom are irreversible and begin a few hours after envenomation (da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004). Accordingly, the type and effectiveness of the treatment are influenced by the amount of time between the spider bite and the diagnosis.



Fig. 2. Cutaneous loxoscelism. A – A female patient bitten on the thigh. The lesion (2 days post-bite) is characterized by edema and erythema, paleness and hemorrhagic areas (marble plaque about 14 cm in diameter), and blistering with hemorrhagic content. B – Male patient bitten on the calf. Two days after spider bite, the injury appeared with extensive bruising, serous blisters that progressed rapidly to hemorrhagic content and burning pain with the additional presence of a cutaneous rash, myalgia and dizziness. Twenty days after bite, the patient presented with desquamation at the injury site without ulcer formation. C and D – Male patient bitten on the inner left thigh while wearing clothes. Four days (C) after the bite, local damage is present and characterized by edema and erythema with ecchymotic, paleness and hemorrhagic areas (marble plaque) and the presence of necrosis 20 days after the bite (D). The presumptive cutaneous loxoscelism because the patient did not bring the spider for formal identification. [Photos are courtesy of Dr. Marlene Entres, Centro de Controle de Envenenamentos de Curitiba, Secretaria de Estado da Saúde, Paraná, Brazil (A, B), and Dr. Ceila M. S. Malaque, Hospital Vital Brazil – Instituto Butantan, São Paulo, Brazil (C, D)]. The colored figure refers to the on-line image. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

However, the effectiveness of the treatments described in the international literature has been widely debated, and a definitive treatment has not yet been established (Isbister et al., 2003; da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Pauli et al., 2009; Isbister and Fan, 2011). The bite severity, however, can be estimated by laboratory tests and clinical characteristics, such as evidence of hemolysis (Malaque et al., 2011) and the presence of creatine kinase in the serum, which indicates rhabdomyolysis (França et al., 2002), that can determine the presence of a viscerocutaneous manifestation of envenomation. In these cases of systemic loxoscelism, vigorous hydration and urinary alkalization should be established early to avoid pigment-induced renal failure (Hogan et al., 2004).

Currently, no commercial test is available to confirm loxoscelism, and most patients never see or capture the offending spider; consequently, the diagnosis is usually based on the clinical features presented by the patient. Moreover, the epidemiological information, such as the circumstances of the bite (sleeping, dressing, etc.), the site of the bite, and the timing of the injury progression (because the clinical signs and symptoms of *Loxosceles* envenomation occur slowly), can aid in the diagnosis of loxoscelism. There are many other medical causes of focal skin necrosis (as described previously by literature data)

and laboratory tests can be helpful in determining the presence of these other diseases. In addition, an enzyme-linked immunosorbent assay has been used to detect the venom from patient lesions and sera or the circulating antibodies to the venom, but it is not in widespread clinical use (Gomez et al., 2001, 2002; da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Stoecker et al., 2006; Akdeniz et al., 2007; Stoecker et al., 2009).

## 5. Brown spider venom

*Loxosceles* spider venom is a colorless and crystalline liquid produced from two bulbous glands situated in the cephalothorax of the spider and flows through an inoculator apparatus composed of a pair of chelicerae (dos Santos et al., 2000; da Silveira et al., 2002; da Silva et al., 2004). Histological findings have revealed that these glands are made up of two adjacent layers of striated muscle fibers, one external and the other internal, in contact with an underlying basement membrane that separates the muscle cells from the secretory epithelium and use a holocrine secretion mechanism (dos Santos et al., 2000).

The volume of venom produced by *Loxosceles* spiders is generally on the order of a few microliters, and it contains approximately 20–200 mg of total protein (Binford and

Wells, 2003; da Silva et al., 2004; Senff-Ribeiro et al., 2008). The amount and the content of the venom produced depend on several factors associated with the spider specimen, including species, size, sex, nutritional state and age. Using SDS-PAGE analysis, de Oliveira et al. (2005) showed that significant variations occurred between the content of the *L. intermedia* and *L. laeta* venoms. These variations in the venom content can be enhanced by other differences in their biological activities, such as the more potent dermonecrotic activity (measured by the lesion size) of *L. laeta* venom compared with *L. intermedia* venom observed in rabbits. In addition, the lesions caused by venom from females were larger in area than those lesions caused by venom from males (de Oliveira et al., 2005). Through 2D electrophoresis (IEF and SDS-PAGE), the venom of *L. intermedia* has been found to be enriched mainly in two groups of proteins at 20–40 kDa and 2–5 kDa (Fig. 3).

In vivo experiments using a rabbit model have shown that *Loxosceles* spp. venoms are associated with the development of a characteristic dermonecrotic lesion with gravitational spreading and ecchymosis. Analyses of rabbit skin exposed to *Loxosceles* venoms shown the following

characteristics: an initial edema under the dermis, an increased vascular permeability, an intravascular fibrin network deposition, the thrombosis of dermal blood vessels and the degeneration of the blood vessel walls as well as the infiltration and aggregation of inflammatory cells. At longer exposure times, myonecrosis of the myofibrils and leukocyte infiltration in the skeletal muscle occur. Finally, the destruction of epidermis integrity, massive hemorrhage and the necrosis of surrounding collagen near the epidermis are observed (Ospedalet al., 2002; Tavares et al., 2004; Pretel et al., 2005; Silvestre et al., 2005; Chatzaki et al., 2012). The ability of the venom of *Loxosceles* spiders to be lethal to mice has also been described. Mota and Barbaro (1995) reported this lethality in mice injected with *L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta* venoms, and the LD<sub>50</sub>s determined were 0.48, 0.74 and 1.45 mg/kg, respectively. Appel et al. (2008) found 100% mortality of the mice tested at the concentrations of 50 and 100 mg/kg of *L. intermedia* venom after 16 h post-injection. Silvestre et al. (2005) found an LD<sub>50</sub> of 0.32 mg/kg for *L. similis* venom, and Pretel et al. (2005) indicated an LD<sub>50</sub> of 0.696 mg/kg for *Loxosceles adelaida* venom.

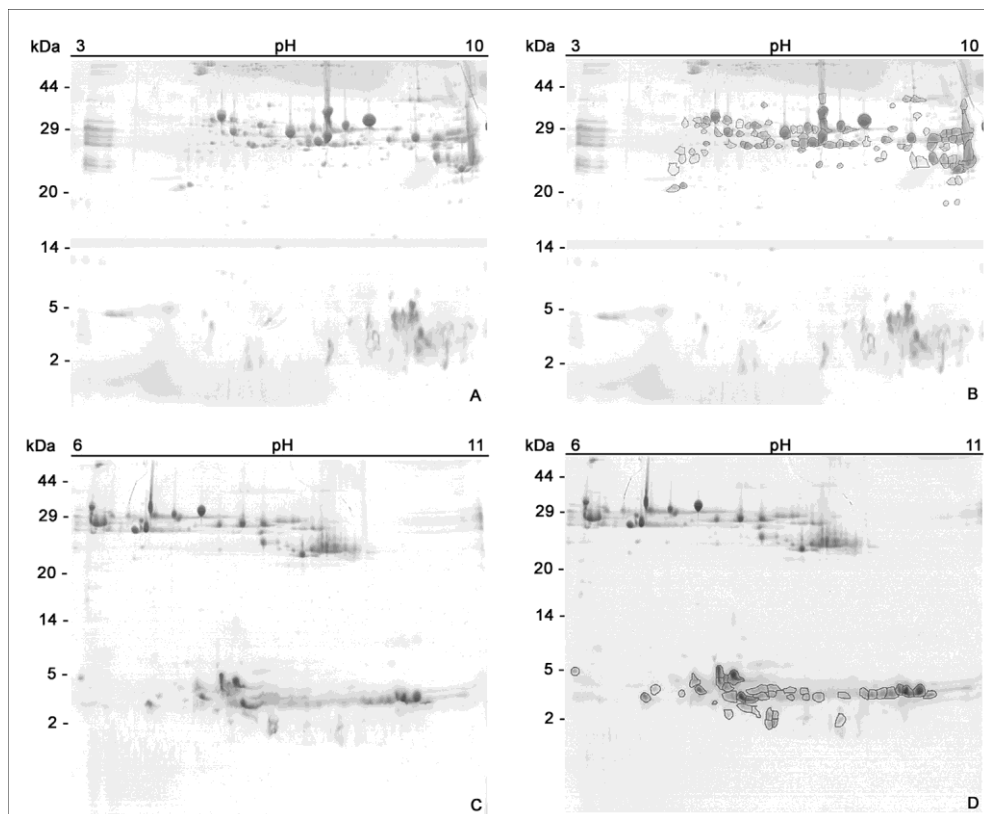


Fig. 3. Two-dimensional (2-DE) protein profile of *Loxosceles intermedia* venom. Samples (150 mg) of *Loxosceles intermedia* crude venom were separated by isoelectric focusing (IEF) on 13-cm immobilized pH gradient (IPG) gel strips with a pH linear range of 3–10 or a pH linear range of 6–11 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) in the first dimension. The second dimension analysis was performed on a 20% polyacrylamide SDS-PAGE gel under reducing conditions. The 2-DE gels were stained with colloidal Coomassie Brilliant Blue. (A) Then, the gels were maintained in a 1% acetic acid solution and scanned using an ImageScanner III LabScan 6.0 (GE Healthcare). The detection of the gel spot and calculation of the isoelectric point (pI) and molecular mass (MM) were obtained using Image Master 2D Platinum software (GE Healthcare). (A) The protein profile of *L. intermedia* venom separated on a pH linear range of 3–10. (B) In total, 97 spots were detected in the 20–40 kDa region, and the spots with pI values from 4.6 to 9.8 are highlighted in circles. (C) The protein profile of *L. intermedia* venom separated on a pH linear range of 6–11. (D) 40 spots were detected in the 2–5 kDa region, and the spots with pI values from 6.1 to 10.4 are highlighted in circles.



The full venom content of the *Loxosceles* spiders is still under investigation; however, many studies have shown that its biochemical composition consists of a complex mixture of biologically active compounds, mainly proteins and peptides with toxic and/or enzymatic action (Veiga et al., 2000a; Gremski et al., 2010). HPLC analysis of whole venom of *L. intermedia* showed the presence of histamine. According results in a sufficient concentration to induce inflammatory responses (Paludo et al., 2009). Additionally, NMR spectroscopy and mass spectrometric analyses of *L. reclusa* crude venom pointed for the presence of sulfated guanosine derivatives as the major small-molecule components of the venom. Nevertheless, results were restricted to chemical analyses and data did not describe for a correlation with biological/pathological activities for these molecules (Schroeder et al., 2008).

In the following sections, the main identified and characterized molecules in the venom of *Loxosceles* spiders will be presented as well as the relevance of these toxins to the understanding of the envenomation process and potential biotechnological applications.

### 5.1. Proteomic analysis of brown spider venom

Proteomic analyses of brown spider venom are scarce and, in general, are focused on the phospholipase D family members. The first report using mass spectrometry for the identification of the proteins in *Loxosceles* spider venom was in 2003 (Binford and Wells, 2003). The aim of this study was to identify the spider phylogenetic groups with sphingomyelinase and to identify the evolutionary origin of this toxin. Venoms from distinct spiders were analyzed, including *L. laeta* and 9 other *Loxosceles* species from Africa and North America. Sphingomyelinase D (SMD) activity was identified in all surveyed *Loxosceles* species and in two *Sicarius* species (*Loxosceles* sister taxon), and the mass spectrometry analyses found several molecules corresponding to the known SMD size range of 31–35 kDa. The *Loxosceles* venom was first submitted to two-dimensional electrophoresis in 2004 by Luciano and colleagues. They demonstrated that *L. intermedia* venom is enriched in cationic and low molecular mass proteins (20–35 kDa). Shortly thereafter, the venoms from *L. adalaida* and *L. gaucho* were subjected to 2D electrophoresis analysis (Pretel et al., 2005). Although the toxins of these venoms displayed a similar distribution with regard to the molecular mass of proteins, only 40% of the components exhibited the same pI and molecular mass in the *L. adalaida* and *L. gaucho* venoms. *L. similis* venom was also analyzed by 2D gel electrophoresis and exhibited protein bands ranging from 28 to 112 kDa, and the pI values were between 4.0 and 7.0, which matched previous profiles of other *Loxosceles* species (Silvestre et al., 2005).

In 2005, the protein contents of the *L. gaucho*, *L. laeta* and *L. intermedia* venoms were analyzed using 2D electrophoresis. The protein profiles of these three different venoms were similar, possessing the majority of protein bands in the 30–35 kDa range. All *Loxosceles* species presented protein bands of a high molecular mass (45–94 kDa) and exhibited few proteins in the low molecular mass region (14–25 kDa) (Machado et al., 2005).

To identify the dermonecrotic proteins in *L. gaucho* venom, several protein bands present in the 30–35 kDa range after separation by 2D electrophoresis were analyzed using mass spectrometry de novo sequencing combined with N-terminal chemical sequencing. Only eight spots were identified as sphingomyelinase D (Machado et al., 2005). The low abundance of all other protein bands analyzed did not enable their identification. In addition, by LC-MS analysis, 11 distinct proteins were detected in the molecular mass range of the dermonecrotic toxins, suggesting that more isoforms of sphingomyelinase D could be present in *L. gaucho* venom (Machado et al., 2005). The difficulties of protein identification in brown spider venoms using MS approaches are due to the limited amount of *Loxosceles* protein sequences available in online data banks. Thus, sequencing the *Loxosceles* genome is still an ongoing challenge in loxoscelism research that will help guide future studies in this area. More recently, a proteomic analysis was performed using the *L. intermedia* venom by MudPIT (Multidimensional protein identification technology). This approach allowed the identification of 39 proteins; 14 proteins were grouped as toxins generally found in animal venoms and were considered responsible for the tissue damage observed in loxoscelism (dos Santos et al., 2009).

Thus, mass spectrometry and proteomic analysis are underused in the investigation of brown spider toxins. These approaches could be applied in many studies, such as a complete analysis of the protein content of *Loxosceles* venoms to generate a *Loxosceles* protein data bank and the identification of the post-translational modifications of the toxins. In addition, these techniques could be helpful in analyzing the in vivo effects of *Loxosceles* crude venom or a specific recombinant toxin on certain tissues by examining the protein content after treatments.

### 5.2. Molecular biology approaches for studying brown spider venom

The advent of molecular biology has allowed the development of numerous novel techniques and applications that have enriched the knowledge in many scientific fields. Specifically, molecular biology has introduced new approaches for studying venoms and insights into their mechanisms of action.

One of the most successful tools applied in the study of the *Loxosceles* venoms is undoubtedly the cloning and heterologous expression of recombinant toxins, which circumvent the difficulties presented by the low amounts of venom that can be collected from these spiders (Senff-Ribeiro et al., 2008; Catalan et al., 2011). Fernandes-Pedrosa et al. (2002) published the first report of the cDNA cloning and expression of a *Loxosceles* toxin, in which a functional phospholipase D (SMase I) obtained from a cDNA library of *L. laeta* venom glands was expressed. Thereafter, several recombinant phospholipases D of other *Loxosceles* species were produced and allowed for the complex biological and biochemical characterization of these toxins (Kalapothakis et al., 2002; Araújo et al., 2003; Lee and Lynch, 2005; Tambourgi et al., 2005; Chaim et al., 2006; da Silveira et al., 2006, 2007b; Olvera et al., 2006;

Ribeiro et al., 2007; Appel et al., 2008; Christoff et al., 2008; de Almeida et al., 2008; Kusma et al., 2008; Chaves-Moreira et al., 2009; de Santi Ferrara et al., 2009; Paludo et al., 2009; Catalan et al., 2011; Chaim et al., 2011b; Chaves-Moreira et al., 2011; Zobel-Thropp et al., 2012; Vuitika et al., 2013; Wille et al., 2013). Recently, two recombinant phospholipases D (recLiD1 and LiRecDT1) were developed as tools to assay the sphingomyelinase D activity in crude venoms or recombinant enzymes (Gomes et al., 2011). Concurrently, these techniques also revealed that phospholipases D comprise a family of toxins in *L. intermedia* venom, as several isoforms were described (Chaim et al., 2006; da Silveira et al., 2006; da Silveira et al., 2007b; Appel et al., 2008; Vuitika et al., 2013; Wille et al., 2013).

Site-directed mutagenesis of recombinant *Loxosceles* phospholipases D allowed for the production of recombinant molecules with drastically decreased enzymatic activity used as tools to elucidate the major role of the catalytic activity of this enzyme's toxicity (Lee and Lynch, 2005; Kusma et al., 2008; Chaim et al., 2011b; Chaves-Moreira et al., 2009).

In addition, the recombinant toxins allowed for the resolution of the crystal structures of two *Loxosceles* phospholipases D, SMase I from *L. laeta* (class I PLD) and LiRecDT1 from *L. intermedia* (class II PLD) (Murakami et al., 2005; de Giuseppe et al., 2011; Ullah et al., 2011). These studies were fundamental in the understanding of the toxins' catalytic mechanisms.

Recombinant toxins could be used in animal immunization, thus eliminating the need of spiders as a source of venom (Gutiérrez et al., 2011). Recombinant phospholipases D have already been tested as antigens for the development of a polyvalent antivenom, which is effective in the neutralization of the crude venom and for understanding of antigenicity of toxins (Alvarenga et al., 2003; Olvera et al., 2006; de Moura et al., 2011; Mendes et al., 2013).

Although the vast majority of studies focus on producing phospholipases D as recombinant molecules, more recent studies set out to produce other recombinant *Loxosceles* toxins. For instance, a recombinant metalloprotease from *L. intermedia* venom has been produced and characterized (da Silveira et al., 2007a). Additionally, a recombinant hyaluronidase from *L. intermedia* venom was recently produced and used to demonstrate the role of this toxin in the venom (Ferrer et al., 2013). Moreover, a TCTP member-family toxin (Sade et al., 2012) and an Inhibitor Cystine Knot peptide (Matsubara et al., 2013) have also been cloned and expressed and will enable functional and structural studies to further characterize these poorly studied brown spider venom toxins. As will be further discussed below, these recombinant toxins enabled additional insights into loxoscelism and will also be putatively useful as tools for a variety of biotechnological applications.

The evolutionary aspects concerning both *Loxosceles* specimens and phospholipase D toxins have been thoroughly investigated by employing molecular biology techniques, such as cDNA, rRNA and genomic sequencing, analyses of positive selection, structural modeling of amino acid conservation and phylogenetic analyses (Binford et al., 2005, 2008, 2009; Cordes and Binford, 2006; Duncan et al., 2010).

Thus, these molecular biology techniques underlie the recent advances in the understanding of the *Loxosceles* toxins that occurred in the last few decades. Novel technologies not yet applied specifically to the study of *Loxosceles* toxins are promising, such as quantitative PCR, RNA interference and the expression of recombinant toxins in eukaryotic cells. Molecular biology approaches not only expand the knowledge of spider biology and the pathophysiology of loxoscelism but also reveal novel molecules for biotechnological approaches.

## 6. Highly expressed toxin families

Over the last few years, several studies focusing on the expression profiles of venomous glands of various organisms, such as snakes, scorpions and spiders, have been conducted. As expected, most of the profiles showed the prevalence of the toxin families that have a direct role in the main signs and symptoms observed in envenomation with these animals. In addition, some profiles showed that the highly expressed toxins are mainly involved in the mechanisms of prey capture for feeding purposes (Zhang et al., 2010; Rokyta et al., 2011; Ma et al., 2012).

In *Loxosceles* spider venom, the transcriptome analysis expression profiles of the venomous glands of different species showed different profiles of the highly expressed toxin families. On one hand, Fernandes-Pedrosa et al. (2008) reported the prevalence of transcripts coding for phospholipase D toxins in the *L. laeta* venomous gland. Subsequently, Gremski et al. (2010) affirmed that in the *L. intermedia* venomous gland, transcripts coding for ICK peptides were prevalent. This observation is consistent with the fact that the primary role of brown spider venom, as in all arachnids, is to paralyze or kill envenomed prey. Hypotheses supporting the differences in the expression levels of these toxins have been discussed previously (Gremski et al., 2010).

Both the *L. laeta* and *L. intermedia* transcriptomes exhibit high expression of the phospholipase D (PLDs) and metalloprotease toxin families in the venomous glands. In fact, PLDs (referred to as sphingomyelinases D by Fernandes-Pedrosa et al., 2008) are able to reproduce the major symptoms of loxoscelism. Moreover, a recent study demonstrated that PLDs also possess a potent insecticidal activity (Zobel-Thropp et al., 2012). Thus, based on the known activities of *Loxosceles* PLDs in vertebrates and arthropods, it is not surprising that this toxin family is highly expressed in brown spider venom glands.

Metalloproteases are also highly expressed toxins in *L. laeta* and *L. intermedia* venom glands (Fernandes-Pedrosa et al., 2008; Gremski et al., 2010). They comprise a family of venom enzymes and may be involved in the initial digestion of prey. These toxins may also have a role in the hemorrhaging observed in loxoscelism and in the systemic spreading of other toxins in victims (da Silveira et al., 2007a; Trevisan-Silva et al., 2010).

Analyses of venom gland expression profiles reveal a consistent redundancy of transcripts coding for the toxins that are highly expressed (Cidade et al., 2006; Neiva et al., 2009). Functional redundancy in proteins is a rare phenomenon; venoms represent a rare case of this

phenomenon (Morgenstern and King, 2013). Some authors argue that to maintain effective toxins against prey and predators, the genes encoding venom peptides and proteins underwent multiple duplication events. In turn, the duplicated genes acquired related or even novel functions through adaptive evolution (Ma et al., 2012). In fact, because these highly expressed toxins are often related to the venom's main actions, the genes encoding these toxins can be assumed to more likely undergo multiple duplication events, generating redundancy.

### 6.1. Phospholipases D

The phospholipase D (PLD) family of toxins is the most studied and well-characterized component in the *Loxosceles* species venoms. These molecules have been reported to play an important role in the development of clinical sign and symptoms in loxoscelism. Due to their ability to trigger dermonecrosis in vivo, the brown spider PLDs are also known as dermonecrotic toxins (da Silva et al., 2004; Appel et al., 2005; Swanson and Vetter, 2006).

Dermonecrotic toxins are soluble in water or physiological buffers and active enzymes are secreted by the brown spider venom glands. These molecules catalyze the hydrolysis of phospholipids, such as sphingomyelin, at a terminal phosphodiester bond to release choline and produce ceramide 1-phosphate (C1P) (da Silva et al., 2004; Chaim et al., 2011b; Wille et al., 2013). PLDs are also able to hydrolyze lysophosphatidylcholine in a  $Mg^{2+}$  dependent-manner (van Meeteren et al., 2004; Chaim et al., 2011b; Horta et al., 2013; Wille et al., 2013). These toxins are proteins which vary in molecular mass from 30 to 35 kDa, and include a signal peptide followed by a pro-peptide. The amino acid sequences of PLDs are highly conserved (55–99%), especially in the residues around the catalytic cleft. Based on phylogenetic studies, PLDs have been distributed in six different groups of the Loxtox family (*Loxosceles* toxin) (Chaim et al., 2006; Kalapothakis et al., 2007). In the same vein, Binford et al. (2009) have proposed a new nomenclature based on the evolution and phylogenetics of the PLD genes, termed the SicTox family (Sicariidae Toxin).

Gremski et al. (2010) revealed that 9% of the analyzed transcripts from the *L. intermedia* venom gland corresponded to PLDs, comprising 20.2% of all the toxin-encoding ESTs (Expressed Sequence Tags), which is a very significant proportion of the toxins. For *L. laeta*, the content of the PLD-encoding transcripts was present at higher levels (16.3% of all ESTs present in database hits). However, the transcriptome analysis for *L. laeta* had methodological limitations due to using only female specimens, which are already known to produce a greater quantity of venom when compared with male spiders (Fernandes-Pedrosa et al., 2008; Gremski et al., 2010). Moreover, the *L. intermedia* transcriptome analysis criteria for bioinformatics screening provided new putative isoforms of PLD (Vuitika et al., 2013), which can be included as novel groups in the LoxTox family (Kalapothakis et al., 2007). These data corroborate the findings of Machado et al. (2005), who identified at least 11 PLD isoforms in the venom of *L. gaucho*, termed Loxnecrogin, or data

reported by Wille et al. (2013), which showed by 2D electrophoresis at least 25 spots immunologically related to PLD toxins in the *L. intermedia* crude venom.

Several PLD isoforms were also characterized in the venom of other *Loxosceles* species. In *L. reclusa* venom, the native PLDs were present at molecular mass of approximately 32 kDa, and the four active isoforms were characterized as able to induce dermonecrotic lesions, hemolysis, and platelet aggregation (da Silva et al., 2004; Vetter, 2011a, 2011b). Two PLD isoforms, SMase I (32 kDa) and SMase II (35 kDa), were also described in *L. laeta* venom, which experimentally demonstrated complement-dependent hemolysis, dermonecrosis and hydrolysis of sphingomyelin (Fernandes-Pedrosa et al., 2002; de Santi Ferrara et al., 2009). Catalan et al. (2011) reported two new PLD isoforms in *L. laeta*, rLIPLD1 was dermonecrotic and active on sphingomyelin while rLIPLD2 seemed to be inactive; but rLIPLD2 was cloned and expressed and was missing a large portion of the PLD region, i.e., it did not include the initial amino acids of the catalytic site, such as His<sup>12</sup>. From *L. intermedia* venom, many PLD isoforms have been described, and nine isoforms have already been expressed as recombinant proteins. It has been shown that recombinant isoforms of PLD are able to reproduce most of the toxic effects observed in loxoscelism and antigenic properties of the venom (Kalapothakis et al., 2002; Fernandes-Pedrosa et al., 2002; Chaim et al., 2006; da Silveira et al., 2006; da Silveira et al., 2007b; Appel et al., 2008; Vuitika et al., 2013). Several isoforms of PLD were also very well characterized and cloned from the venom of other *Loxosceles* species (Ramos-Cerrillo et al., 2004; Barbaro et al., 2005; Magalhães et al., 2013).

The PLDs are responsible for a large variety of disturbances in loxoscelism. Both native and recombinant forms of PLDs have been reported to trigger dermonecrotic lesions, an increase in vascular permeability, an intense inflammatory response at the inoculation site and at a systemic level, platelet aggregation, hemolysis, nephrotoxicity, and even lethality in controlled experiments (Cunha et al., 2003; Appel et al., 2005; da Silveira et al., 2006, 2007b; Swanson and Vetter, 2006; Kusma et al., 2008; Senff-Ribeiro et al., 2008; Chaves-Moreira et al., 2009; Tambourgi et al., 2010; Chaim et al., 2011b).

Toxicity to a variety of cell types and structures is often enzyme dependent. At the beginning of the Loxtox protein family characterization, it was thought that these toxins were exclusively able to cleave the head-groups of sphingomyelin, the so-called sphingomyelinases. Further studies have described other substrates to be included as susceptible to catalysis by the PLDs, such as glycerophospholipids and lysophospholipids. Thus, the term phospholipase D for brown spider dermonecrotic toxins is more suitable (Lee and Lynch, 2005; Chaim et al., 2011a; Chaves-Moreira et al., 2011; Wille et al., 2013).

Studies comparing recombinant isoforms with distinct capacities of degrading substrates have shown differences in the intensity of their effects (Gomez et al., 2002; Chaim et al., 2011b; Stock et al., 2012). Several recombinant PLD isoforms from the *Loxosceles* genus were heterologously produced in *Escherichia coli*. These recombinant PLDs are easily obtained in their soluble and active enzyme forms in



large amounts, which provided interesting results concerning the structural and functional properties of the PLDs. For example, critical data examining the putative enzyme mechanism and three-dimensional scaffold were obtained by X-ray crystallography (more details, see Sections 10 and 11). In summary, research into the catalytic site revealed important insights into the enzymatic capabilities of each isoform (Murakami et al., 2005, 2006; de Giuseppe et al., 2011; Ullah et al., 2011). Recently, de Giuseppe et al. (2011) published the crystal structure of LiRecDT1 from *L. intermedia*, indicating that it contained an additional disulfide bond in the PLD structure catalytic loop compared with the previously described PLD from *L. laeta*. These details of PLD molecules can explain the distinct enzymatic behaviors of the venom from different species. PLDs with different structures could have different substrate affinities or enzymatic activities; therefore, these differences could explain the clinical symptoms or severity observed at the local bite site or the systemic effects during envenomation by different species of the *Loxosceles* genus.

Furthermore, there are clear differences in the hydrolytic ability of PLD isoforms within the *Loxosceles* genus (Gomez et al., 2002; Chaim et al., 2011a; Stock et al., 2012). All studies with the named LiRecDTs (isoforms 1–7) showed dermonecrosis at different levels in rabbit skin, consistent with the results of the spectrofluorimetric analysis of sphingomyelin hydrolysis (Appel et al., 2008; Chaves-Moreira et al., 2011; Vuitika et al., 2013). Ribeiro et al. (2007) reported that LiRecDT1 and LiRecDT2 were similar in all functional tests, such as in vivo edema or cytotoxicity, while the LiRecDT3 effect was significantly less intense. The amino acid alignment observed paralleled these results: LiRecDT1 and LiRecDT2 were very similar, but LiRecDT3 slightly was different. LiRecDT3 showed some important differences in hydrophobicity at the boundaries of the catalytic site, which can explain its differential performance.

Furthermore, site-directed mutagenesis of His<sup>12</sup> of LiRecDT1, predicted to play a central role during catalysis, was not sufficient to completely abolish its catalytic activity. Moreover, the LiRecDT1H12A mutant isoform has a drastic reduction in its enzymatic activity, but with no change in the secondary structure, compared with LiRecDT1. Interestingly, the mutant isoform was unable to induce the same level of any activity examined, but the attachment to the cell surface or to mobilized lipids was unaltered (Kusma et al., 2008; Paludo et al., 2009; Chaim et al., 2011b; Wille et al., 2013). Most likely, the other protein domains besides the catalytic cleft were preserved, as they might be relevant for the interaction of the toxin with the cell membrane or lipid substrates. In general, the main value of PLD catalysis can be related to the release of lipid metabolites, which could modulate a wide range of biological events, such as the cell cycle, cell proliferation, cell differentiation processes and cell death (Marchesini and Hannun, 2004; Tani et al., 2007).

Studies have shown the upregulation of the expression of proinflammatory cytokines/chemokines after the exposure of human fibroblasts to the *L. reclusa* PLD (Dragulev et al., 2007), which hydrolyzes the cell membrane sphingomyelin to ceramide 1-phosphate (C1P) and would lead to

a receptor-dependent inflammatory response. This idea challenged the hypothesis that lysophosphatidic acid (LPA) was a preferential product and bioactive metabolite instead of C1P, due to the relative LPC abundance in the plasma as a substrate (van Meeteren et al., 2004, 2007). Recently, Horta et al. (2013) showed that cell death was induced by *L. similis* whole venom (LsV) and especially with a recombinant isoform of *L. intermedia* PLD, recLiD1 (Kalapothakis et al., 2002; Felicori et al., 2006). LPA released by the PLD activity of LsV and recLiD1 was unable to activate LPA receptors in the presence of an LPA1/LPA3 antagonist. This effect was indirectly observed by ELISA assays for IL-6, IL-8, CXCL1, and CXCL2. Moreover, the authors did not find that LPA played a role in the apoptosis induced by LsV or recLiD1 in fibroblast and endothelial cells in vitro, which may be related to other LPA-independent stimuli or to C1P acting on the cell membrane receptors, as has been previously described (Horta et al., 2013). The variety of molecular mechanisms triggered by *Loxosceles* PLDs and their lipid metabolites remains open to further investigation as a complex event dependent on the cell types involved, lipid substrate abundance and availability and intracellular signaling cascades. PLDs can serve as biotools for the study of cell–cell communication via cell membranes in the context of inflammation. PLD isoforms have been proposed as potential models for designer drugs or other biotechnological applications (Senff-Ribeiro et al., 2008; Tambourgi et al., 2010; Chaim et al., 2011a). The production of more stable PLD isoforms with enhanced enzymatic activity would greatly contribute to many areas of toxicology and to the complete understanding of the biochemical features of PLDs, their many biological implications and their related molecular mechanisms.

#### 6.1.1. Phospholipase D topology and structure

The amino acid sequence comparisons of spider venom phospholipases D indicate that they contain either 284 or 285 amino acids and display a significant degree of homology (de Santi Ferrara et al., 2009). This single polypeptide chain folds to form a distorted barrel where the inner barrel surface is lined with eight parallel  $\beta$ -strands (termed A–H) linked by short flexible loops to eight  $\alpha$ -helices (termed helices 1–8) that form the outer surface of the barrel (Murakami et al., 2005) (Figs. 4 and 5). This structural motif was first observed in the structure of the triose phosphate isomerase (TIM) and is referred to as a TIM barrel or as an (a/b)<sub>8</sub> barrel. The topology diagram (Fig. 5) presents a structural schematic where the  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -strands are depicted as cylinders and arrows, respectively, and the central region forms the (a/b)<sub>8</sub> barrel. The interconnecting loops are primarily hydrophilic and hydrophobic in the upper and lower sections, respectively (Fig. 5). A short  $\beta$  strand ( $\beta^0$ ) is inserted between strand B and helix 2, and two short helices ( $3^0$  and  $4^0$ ) are inserted between helix 3 and strand D, and helix 4 and strand E. The catalytic loop is stabilized by a disulfide bridge (Cys<sup>51</sup> and Cys<sup>57</sup>) and a second disulfide bridge (Cys<sup>53</sup> and Cys<sup>201</sup>) is present only in the class II enzymes (de Giuseppe et al., 2011), which links the catalytic loop to the flexible loop to significantly reduce the flexibility of the latter loop, as evidenced by the mean temperature factors (Figs. 4 and 6).

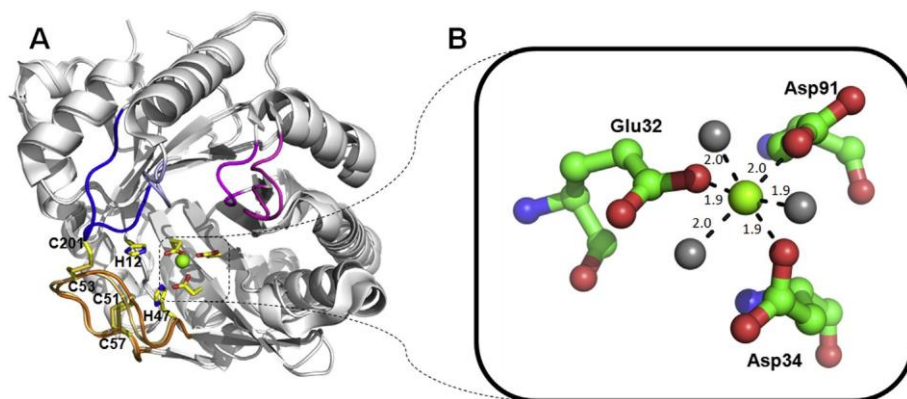


Fig. 4. Structural alignment between the class I and class II phospholipases D. (A) The residues involved in the metal-ion binding and catalysis are highlighted. The catalytic, flexible and variable loops are colored in orange, blue and magenta, respectively. The dark and light colors refer to phospholipase D II and phospholipase D I, respectively. The  $\text{Mg}^{2+}$  ion is represented by a green sphere. The disulfide bridges are represented as yellow-colored sticks. (B) The coordination sphere of the  $\text{Mg}^{2+}$  ion. The figure color codes refer to the on-line images. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Because the  $\alpha$ -helices,  $\beta$ -strands and loops vary in length and character, the barrel with a surface area of  $11,254 \text{ \AA}^2$  is significantly distorted (Fig. 4). The interior of the barrel is densely packed with hydrophobic amino acids, and the short N-terminal section and the C-terminal extension, which contains a short helix ( $8^{\text{h}}$ ), a  $\beta$ -strand ( $\text{H}^{\text{b}}$ ) and a random coiled region, serve to cap the torus of the far side of the barrel. The surface loops forming the near side of the barrel are mainly hydrophobic, and a narrow cavity provides access to the catalytic site, which is characterized by a ring of negatively charged amino acids (Murakami et al., 2005; de Giuseppe et al., 2011). The catalytic, variable and flexible loops are located on the same face of the barrel and are colored orange, magenta and blue, respectively (Fig. 4). The catalytic and  $\text{Mg}^{2+}$  binding sites are located in a shallow depression and contain His<sup>12</sup>, Glu<sup>32</sup>, Asp<sup>34</sup>, Asp<sup>91</sup>, His<sup>47</sup>, Asp<sup>52</sup>, Trp<sup>230</sup>, Asp<sup>233</sup>, and Asn<sup>252</sup>, which are fully conserved in *Loxosceles* PLD isoforms (Figs. 4 and 7) (Murakami et al., 2005; de Giuseppe et al., 2011).

Mutagenesis studies of PLDs (de Giuseppe et al., 2011; Ullah et al., 2011) and its crystal structure (Murakami et al., 2005) indicate the involvement of two histidines that are in close proximity to the metal ion-binding site in the acid-base catalytic mechanism. Based on the structural results, His<sup>12</sup> and His<sup>47</sup> of PLD have been identified as the key residues for catalysis and are assisted by a hydrogen bond network that involves Asp<sup>52</sup>, Asn<sup>252</sup>, and Asp<sup>233</sup>. The metal ion is coordinated by Glu<sup>32</sup>, Asp<sup>34</sup>, Asp<sup>91</sup>, and solvent molecules (Fig. 4B).

#### 6.1.2. Involvement of the $\text{Mg}^{2+}$ ion in the phospholipase D catalytic mechanism

The  $\text{Mg}^{2+}$  ion is essential for catalysis, and its binding site is completely conserved in all spider venom phospholipases D.  $\text{Mg}^{2+}$  ion is octahedrally coordinated (with a mean  $\text{Mg}^{2+}$ –O distance of  $1.98 \text{ \AA}$ ) (Fig. 4) equatorially by the carboxylate oxygens of the side chains of Glu<sup>32</sup> and Asp<sup>34</sup> and by two tightly bound water molecules and

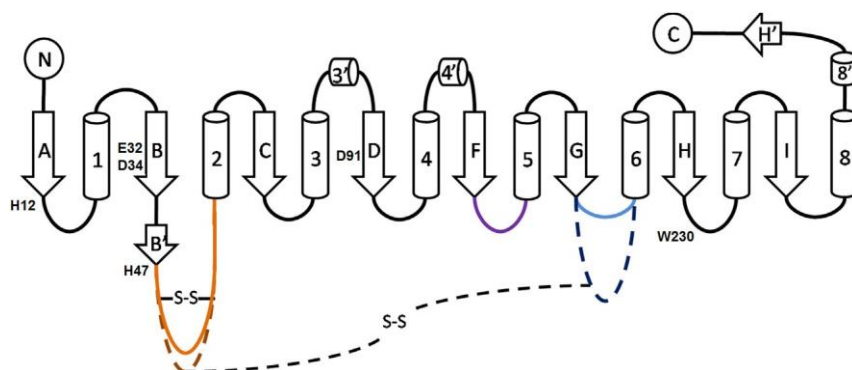


Fig. 5. Structural topology of *L. laeta* phospholipase D I and *L. intermedia* phospholipase D II. The  $\beta$ -strands (arrows) and  $\alpha$ -helices (cylinders) forming the (a/b)<sub>8</sub> barrel are labeled A–H and 1–8, respectively. The  $\beta$ -strands and  $\alpha$ -helices not belonging to the core are designated with a prime. The positions of the catalytic loop B (orange), variable loop E (magenta), flexible loop F (blue), and the disulfide bridge (S–S) are indicated. The approximate relative positions of the amino acids involved in the catalysis and  $\text{Mg}^{2+}$  ion binding are indicated. The dashed line represents the additional disulfide bond in phospholipase D II. Letters N and C represent the positions of amino- and carboxy-terminal domains of proteins. Figure color codes refer to the on-line images. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



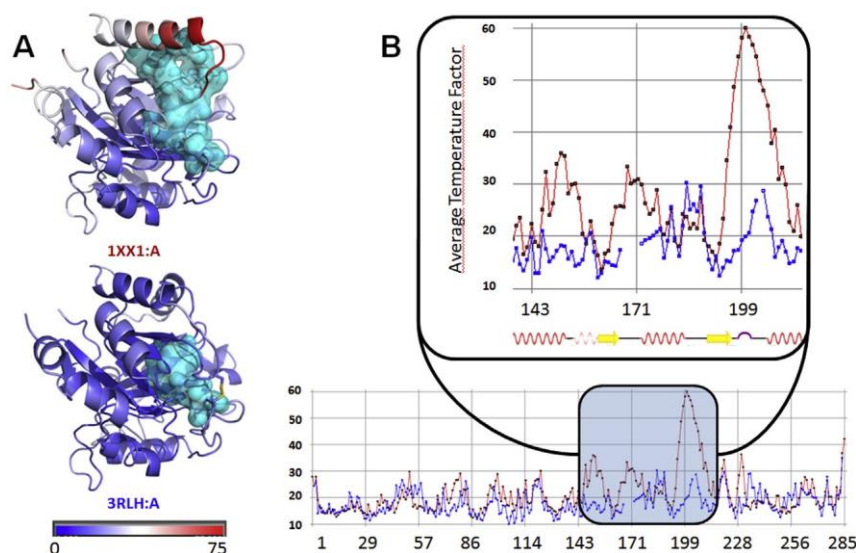


Fig. 6. Protein flexibility by B factor analysis. (A) Ribbon representations of the phospholipase D structures colored to indicate the mean temperature factors as indicated by the bar graph. A light blue surface indicates the cavity volume of the active site. (B) The mean temperature factors (blue, main chain; red, side chain) as a function of the amino acid residues. The inset highlights the flexible region as discussed in the text. 1XX1 and 3RLH are the protein data bank codes for the Class I and Class II enzymes, respectively. Plot performed by MSSP module of BlueStar STING (Neshich et al., 2005). Figure color codes refer to the on-line images. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

apically by the side-chain carboxylate oxygen atoms of the Asp<sup>91</sup> and by a water molecule, which is also hydrogen bonded to the Glu<sup>32</sup>O<sup>ε1</sup> atom. The enzyme structure determined in the presence of a bound sulfate ion (Murakami et al., 2005), which is considered to occupy the

position of the substrate phosphate moiety, is coordinated by three solvent molecules, two of which also coordinate the Mg<sup>2b</sup> ion. The indole ring of Trp<sup>230</sup> is partially disordered and likely plays a role in stabilizing the choline head group of the substrate.

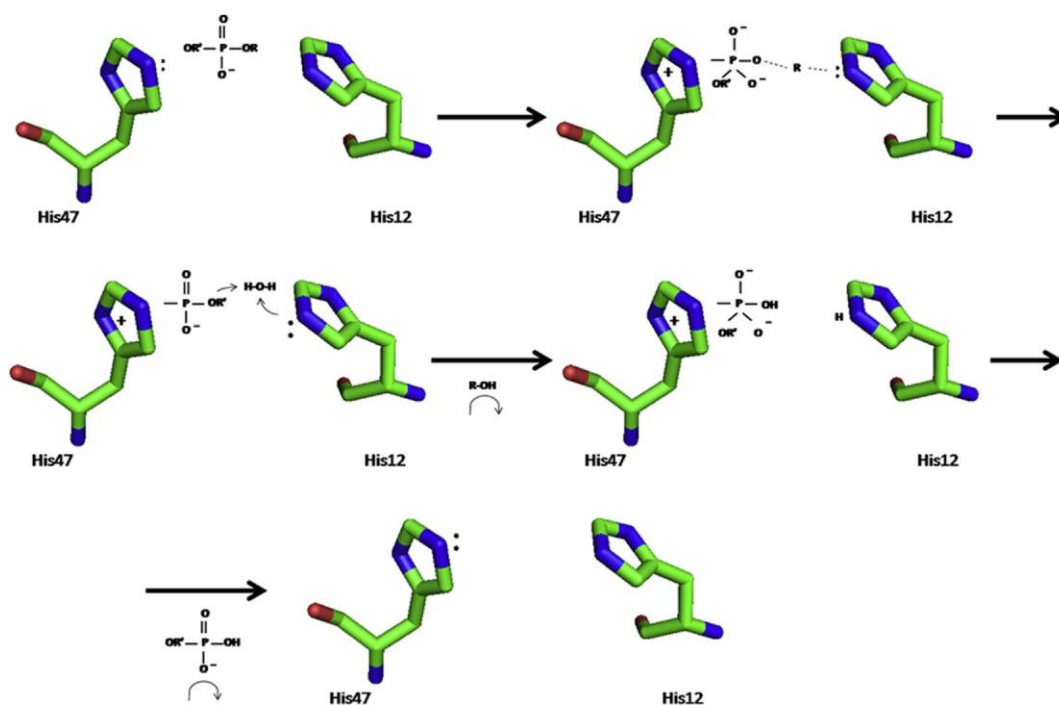


Fig. 7. The reaction mechanism of phospholipase D. The acid-base catalytic mechanism involves His<sup>12</sup> and His<sup>47</sup>. R and R<sup>l</sup> indicate ceramide 1<sup>l</sup>-phosphate and choline, respectively.

Based on the crystal structures of phospholipase D, a two-step catalytic mechanism has been suggested where His<sup>12</sup> and His<sup>47</sup> play important roles (Fig. 4). In the first step of this mechanism, His<sup>47</sup> plays a role as a nucleophile that initiates the attack on the substrate scissile phosphodiester bond, which is followed by the formation of a pentacoordinated intermediate that is subsequently destabilized by the donation of a hydrogen atom by His<sup>12</sup>, leading to the formation of a choline molecule. In the second reaction step, His<sup>12</sup> abstracts a proton from a solvent molecule that then initiates a nucleophilic attack on the stable covalent histidine intermediate, resulting in the formation of the second product, ceramide 1-phosphate, and a return to the initial state. The Mg<sup>2+</sup> ion is important for the substrate recognition and binding and for further stabilization of the intermediate state in the two-step catalytic mechanism.

## 6.2. Astacins

The astacins are a family of proteases belonging to the metzincin super family, which are grouped with the zinc-dependent metalloproteases (Gomis-Rüth, 2003; Sterchi et al., 2008). Many metalloproteases are characterized by a conserved pentapeptide HEXXH in the active site, which is essential for metal ion coordination and catalysis (Sterchi et al., 2008).

The first report of proteases in *Loxosceles* venom was described in *L. reclusa* venom, which showed protease activity against *Heliothis virescens* and *Musca domestica* larvae, as observed by histochemical techniques (Eskafi and Norment, 1976). In addition, the *L. reclusa* venom protease activity was assayed on L-aminoacyl-b-naphthylamide derivatives and was shown to act more efficiently on L-Leucyl-b-naphthylamide, although other derivatives were also susceptible (Jong et al., 1979).

In *L. intermedia* venom, two metalloproteases were identified, Loxolysin A, a 20–28 kDa protease that degrades the Aa and Bb chains of fibrinogen and fibrinogen, and Loxolysin B, a 30–32 kDa protease with gelatinolytic activity (Feitosa et al., 1998). Similarly, proteolytic enzymes were identified in *L. rufescens* venom: a 23 kDa fibrinogenolytic protease and a 27.5 kDa gelatinolytic protease, which were both inhibited by 1,10-phenanthroline (Young and Pincus, 2001). The fibrinogenolytic activity was reported in both *L. reclusa* venom and *L. laeta* venom, which showed the same partial effects that were observed in *L. intermedia* venom (i.e., the degradation of the Aa and Bb fibrinogen chains) (Zanetti et al., 2002). *L. deserta*, *L. gaucho* and *L. reclusa* venoms were also shown to include metalloproteases (Barbaro et al., 2005). Other extracellular matrix components were also demonstrated as targets for the *Loxosceles* metalloproteases, such as entactin and heparan sulfate proteoglycans (Veiga et al., 2000b, 2001a). Although with the identification of these *Loxosceles* proteases, the proof that proteases are venom components and not contamination derived from gastric contents during venom extraction was reported in two crucial studies of *L. rufescens* venom and *L. intermedia* venom (Young and Pincus, 2001; da Silveira et al., 2002). The proteolytic effect of *L. rufescens* venom discussed above was observed in venom obtained by micro-dissection of the venom glands, a

procedure that ensures the absence of gastric contaminants (Young and Pincus, 2001). For *L. intermedia* venom, the protein profile and proteolytic activity were very similar between the venom collected by electrostimulation (possible contamination) and macerated venom glands (free from gastric contaminants) (da Silveira et al., 2002).

A sequence encoding an astacin-like metalloprotease was first identified in a cDNA library of *L. intermedia* venom glands (da Silveira et al., 2007a). Astacin-like proteases (Merops M12A family) have a consensus sequence of 18 amino acids forming the catalytic domain –HEXXHXXGXXHEXXRXDR– in which the three histidines are involved in zinc binding, which is necessary for the catalytic activity. In addition, they have a conserved methionine residue involved in a sequence turn, termed a met-turn (MXY) (Gomis-Rüth, 2003; Sterchi et al., 2008; Gomis-Rüth et al., 2012). The identified *L. intermedia* astacin sequence was named LALP (*Loxosceles* astacin-like protease) and possesses astacin family signatures (catalytic domain and met-turn). LALP was shown to be cytotoxic upon rabbit subendothelial cells and able to hydrolyze fibrinogen and fibronectin (da Silveira et al., 2007a). Astacin family members have been described in prokaryotes and eukaryotes and possess diverse and distinct biological functions. In general, they are expressed in specific tissues of mature organisms, and during embryo development, they are temporally and spatially regulated (Gomis-Rüth, 2003; Mörhlen et al., 2003, 2006). The presence of astacin proteases in animal venoms is rare because LALP was the first report in the literature of an astacin molecule as a constituent of animal venom (da Silveira et al., 2007a).

Recently, two new isoforms of astacin-like proteases were identified in *L. intermedia* venom (named LALP2 and LALP3) and in *L. laeta* venom (LALP4) and *L. gaucho* venom (LALP5). These findings demonstrate that astacin proteases are a family of toxins present in *Loxosceles* venoms and that they are important components of these venoms (Trevisan-Silva et al., 2010, 2013). Corroborating the biological importance of the *Loxosceles* astacin-like proteases, transcriptome analyses showed that astacins are high expressed toxins in *L. laeta* and *L. intermedia* venoms (Fernandes-Pedrosa et al., 2008; Gremski et al., 2010). In *L. laeta* venom, astacin's transcripts represents 8% of the total transcripts, and in *L. intermedia* venom, they represent 9.8% of the toxin transcripts, representing the second most expressed toxin in both species (Gremski et al., 2010). Studies concerning the biological activities of *Loxosceles* astacins are essential to improve the knowledge of loxoscelism and to apply these toxins in biotechnology.

## 6.3. Brown spider venom Inhibitor Cystine Knot (ICKs)

In early the 1990s, many venom peptides from spiders, scorpions, cone snails and sea anemones had their structures solved using various techniques. A great number of cysteine-rich peptides were described, including a common structural motif called the “Inhibitor Cystine Knot” (ICK) (Daly and Craik, 2011). These peptides share a common structure with three disulfide bonds and are composed of three antiparallel  $\beta$ -sheets (Craik et al., 2001; Zhu et al., 2003; Daly and Craik, 2011). Two disulfide bonds

form a ring that is crossed by the third bond, which forms the structural motif ICK. This same structural motif is found in two other families: the Cyclic Cystine Knot (CCK) or cyclotide family and Growth Factor Cystine Knot (GFCK) family (Vitt et al., 2001; Craik et al., 2010; Iyer and Acharya, 2011). This molecular scaffold renders ICK peptides highly resistant to protease action, making them good targets for drug design (Daly and Craik, 2011; King, 2011; Moore et al., 2011). The homology between ICK peptides is usually low, but the distribution of cysteine residues is often conserved. Further studies showed that ICK peptides have an amino acid consensus sequence of CX<sub>3-7</sub>CX<sub>3-6</sub>CX<sub>0-5</sub>CX<sub>1-4</sub>CX<sub>4-13</sub>C, where X can be any amino acid (Craik et al., 2001). ICK toxins are quite diverse in their biological activity because they can act in voltage-gated sodium, potassium or calcium channels; mechanosensitive channels; nicotinic acetylcholine receptors or ryanodine receptors (Nicholson et al., 2004; Dutertre and Lewis, 2010).

Among spiders, many ICK toxins have been described. One of the most well-studied families is the d-Atracotoxins (d-ACTX) family isolated from the venom of Australian funnel-web spiders. d-ACTX show a similar action to the sea anemone and scorpion ICK toxins, binding at site 3 of the sodium ion channel, which causes neurotransmitter release in the nerve endings and results in the disturbance of the autonomic and somatic nervous systems (Nicholson et al., 2004).

From *Loxosceles* venom, three insecticide peptides named LiTx 1–3 have already been purified (de Castro et al., 2004). These peptides were isolated from *L. intermedia* venom using a combination of chromatography techniques, and their activities were assessed in Lepidoptera larvae, resulting in an LD<sub>50</sub> of 0.90–1.92 mg/g insect. These authors proposed that LiTx 3 may act on NaV channels as with other toxins and that LiTx 2 and 3 may act on NaV or CaV channels. Furthermore, Fernandes-Pedrosa et al. (2008) analyzed the *L. laeta* transcriptome and found that 0.2% of all toxin transcripts matched with the ICK neurotoxin Magi 3 from *Macrothele gigas* (Corzo et al., 2003), which bind at site 3 of NaV channels. The transcriptome analysis of the *L. intermedia* venom gland showed that 55.5% of all transcripts putatively encode for toxins that potentially represent insecticide peptides and can be classified as ICK peptides. From the 55.5% of transcripts, 2.3% represent transcripts similar to Magi 3, such as those transcripts described for *L. laeta*. The most abundant venom transcripts found were transcripts similar to LiTx 3 (32%), LiTx 2 (11.4%) and LiTx 1 (6.2%). This transcriptome analysis also described transcripts encoding LiTx 4, another ICK peptide not yet characterized, which represent 3.7% of the toxin transcripts. Recently, it was described the cloning, recombinant peptide production, polyclonal antibody obtention and evaluation of the cross-reactivity of a novel toxin with a great similarity to the ICK family of peptides from *L. intermedia* venom. This peptide was named U2-sicaritoxin-Li1b (U2-SCRTX-Li1b) according to the nomenclature proposed by King et al. (2008) (Matsubara et al., 2013).

The interest in ICK toxin class is due to their targeting of ion channels, which are transmembrane protein complexes regulating ion flux and membrane potential. This ability of ICK peptides to specifically bind to some ion channels

provides a great tool not only for electrophysiology and cell biology studies but also for drug design. In addition, the high specificity of spider peptides for insect receptors leads to the proposal of using these peptides for developing novel insecticidal targets or for the development of new biopesticides (Estrada et al., 2007; Dutertre and Lewis, 2010; Klint et al., 2012). Currently, there is no evidence of the involvement of brown spider ICKs in the pathogenesis of spider bites.

## 7. Low level of expression toxin families

*Loxosceles* venoms have demonstrated little variation in overall toxin composition (Ramos-Cerrillo et al., 2004; Barbaro et al., 2005; Fernandes-Pedrosa et al., 2008; Gremski et al., 2010; Trevisan-Silva et al., 2010). The high degree of intragenus toxin preservation is evidence of the evolutionary success of the venom formulation and is suggestive of the important functions of some types of toxins (Trevisan-Silva et al., 2010; Corrêa-Netto et al., 2011). However, transcriptome analyses of *L. intermedia* and *L. laeta* venoms indicate some differences in the level of toxin expression in this genus. In the analyses of the *L. laeta* venom gland expression profile, relatively low numbers of transcripts of serine proteases, enzymatic inhibitors, C-type lectin, hyaluronidases, 5<sup>0</sup>-nucleotidases, chitinases and venom allergens were found (Fernandes-Pedrosa et al., 2008). On the other hand, Gremski and co-workers showed low numbers of transcripts that coded for serine proteases, venom allergen, TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein), hyaluronidases and serine proteases inhibitors (Gremski et al., 2010). The hypotheses that may explain these differences in the profile of toxins with low level expression include the different approaches and methodologies employed in the analyses. Additionally, these differences apply to different species, which reinforce the previous data that showed distinct behaviors among the venoms from distinct *Loxosceles* species.

Venom variations occur at all taxonomical levels and can significantly impact the clinical manifestations and efficacy of anti-venom therapies following a spider bite. Cases of incomplete intragenic antivenom efficacy have been documented, implying a high interspecies venom variation (Casewell et al., 2009). Abundant differences can be observed between the venom compositions of different genera, the venom compositions of different species within a genus and the venom compositions of different individuals within a species (e.g., individuals from different geographical regions). Apparently, the venom composition is subject to strong natural selection pressure as a result of adaptation to specific diets because the primary role of venom is to aid in prey capture (Ruiming et al., 2010). Additionally, toxins with low level of expression do not necessarily possess a low activity. On the contrary, some types of these toxins have been postulated to have a high activity and high stability (Morey et al., 2006; Reitingier et al., 2008; Menaldo et al., 2012; Valeriano-Zapana et al., 2012), and therefore, these molecules would not be synthesized in large amounts. The below sub-items further discuss some of these low level of expression toxin family-members.



## 7.1. TCTP

The *L. intermedia* venom gland transcriptome analysis described the sequence of a protein identified as a member of the TCTP family and revealed that this TCTP is present at relatively low levels in the venom, only 0.4% of the transcripts that encoded toxins (Gremski et al., 2010). The name TCTP stands for Translationally Controlled Tumor Protein, as this protein was described by scientists studying proteins that were regulated at the translational level. The tumor is derived from the first TCTP cDNA sequence described, which was obtained from a human mammary tumor (Bommer, 2012). This protein was also shown to be a histamine-releasing factor (HRF) (McDonald et al., 1995) and a fortilin (Li et al., 2001). The *L. intermedia* TCTP was cloned and expressed as a heterologous protein in an *E. coli* expression system. The functional characterization of the recombinant protein, LiTCTP, showed that this toxin caused edema and enhanced vascular permeability (Sade et al., 2012). The cutaneous symptoms of envenomation with *Loxosceles* venoms include erythema, itching and pain. In some cases, *Loxosceles* spider bites can cause hypersensitivity or even allergic reactions. These responses could be associated with histaminergic events, such as an increase in the vascular permeability and vasodilatation. LiTCTP could be related to these deleterious venom actions as it was identified in *L. intermedia* venom (Sade et al., 2012). Another *Loxosceles* TCTP has been described in the venom gland of *L. laeta* by transcriptome analysis (Fernandes-Pedrosa et al., 2008). Recently, a transcriptome analysis revealed a TCTP protein (named GTx-TCTP) in the venom gland and the pereopodal muscle of the tarantula *Grammostola rosea* (Kimura et al., 2012).

Proteins of the TCTP super family have already been described in the gland secretions of many arthropods, such as ixodid ticks, and in the venom gland of the wolf spider (*Lycosa godeffroyi*), where it was described as the principal pharmacological toxin (Mulenga and Azad, 2005; Rattmann et al., 2008). TCTP family members are described as extracellular HRFs and are associated with the allergic reactions of parasites. Among species from the same genus, the TCTPs are completely conserved (Bommer and Thiele, 2004). A LiTCTP phylogeny tree demonstrates the similarities with the TCTPs from ixodid ticks, which were also characterized as HRFs (Mulenga and Azad, 2005; Sade et al., 2012). In the case of the *Loxosceles* venom gland, the TCTP and other constituents of the whole venom are secreted via a holocrine secretion as determined by ultrastructural studies of the *L. intermedia* venom gland (dos Santos et al., 2000; Gremski et al., 2010). TCTP secretion from cells proceeds via an ER/Golgi-independent or non-classical pathway, most likely mediated by secreted vesicles called exosomes (Amzallag et al., 2004; Hinojosa-Moya et al., 2008). TCTP mRNAs do not encode a signal sequence, and no precursor protein has been described; however, a TCTP protein was found in the biological fluid of asthmatic or parasitized patients, in the saliva of ticks (Bommer and Thiele, 2004; Hinojosa-Moya et al., 2008) and in the crude venom of *L. intermedia*. TCTPs represent a large protein family that is highly

conserved and ubiquitous in eukaryotes, and they members are widely expressed in various tissues and cell types. TCTP protein levels are highly regulated in response to a wide range of extracellular signals and cellular conditions, which points to an involvement in various participating biological functions at diverse biochemical and signaling pathways. In fact, a wide range of functions and different biochemical roles have already been examined in the TCTP family (Bommer and Thiele, 2004; Choi and Hsu, 2007; Bommer, 2012).

TCTP proteins have already been described as calcium-binding proteins (Graidist et al., 2007) and as proteins that interact with the cytoskeleton by binding to and stabilizing microtubules (Bazile et al., 2009). The involvement of TCTP in the mitotic spindle has also been shown, and TCTP is now considered a regulator of mitosis (Burgess et al., 2008). The crucial role of TCTP has also been described in early development. The loss of TCTP expression in mice leads to increased spontaneous apoptosis during embryogenesis and causes lethality (Chen et al., 2007; Susini et al., 2008). TCTP can be described as a multifunctional protein due to the high number of protein partners and the several areas/pathways of cell metabolism where it is involved (Amson et al., 2013a).

The downregulation of TCTP has been implicated in biological models of tumor reversion (Tuynder et al., 2002, 2004), and the protein is the target of various anticancer drugs (Effert, 2005; Telerman and Amson, 2009; Amson et al., 2013b).

Studying LiTCTPs can elucidate the biological aspects of loxoscelism, especially those aspects related to the histaminergic symptoms. Moreover, LiTCTP investigation can provide new insights regarding the TCTP family and its different functions. LiTCTP is a promising subject for study in toxinology and in immunological, allergenic and experimental oncology.

## 7.2. Hyaluronidases

Hyaluronidases are a group of enzymes that degrade hyaluronic acid (HA) and, to a limited extent, chondroitin, chondroitin sulfate (CS) and dermatan sulfate (DS). HA is a ubiquitous component of the vertebrate extracellular matrix where it fills the space between cells and acts as a lubricant and a barrier to the penetration of foreign particles (Markovic-Housley et al., 2000).

This type of matrix-degrading enzyme are found in many animal venoms, such as lizards, scorpions, spiders, bees, wasps, snakes and stingrays (Girish and Kemparaju, 2005; Kemparaju and Girish, 2006; Magalhães et al., 2008). These enzymes are always reported as “spreading factors” in the venoms due to their ability to degrade extracellular matrix components and to increase the diffusion of other toxins from the inoculation site (Kemparaju and Girish, 2006).

Wright et al. (1973) were the first to describe hyaluronidase activity in the *Loxosceles* genus. This work was performed with *L. reclusa* venom, and the purified enzymes were estimated to have molecular mass of 33 and 63 kDa (the 63 kDa protein is thought to be a 33 kDa-dimer) by SDS-PAGE. These enzymes exhibited activity against HA

and CS types A, B, and C. (Wright et al., 1973). Although Loxosceles-derived hyaluronidases alone are not able to produce necrosis, they are thought to be an important factor in the spread of these venoms. The detection by HA-substrate SDS-PAGE of a hyaluronidase of 32.5 kDa from *L. rufescens* venom has been reported (Young and Pincus, 2001). In Loxosceles envenomation, the presence of edema, erythema and necrosis is common, which indicates extracellular matrix disturbances.

Barbaro et al. (2005) found hyaluronidase activity on hyaluronic acid in a 44 kDa protein in *L. deserta*, *L. gaucho*, *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. reclusa* venoms. Shortly after, da Silveira et al. (2007c) showed that *L. intermedia* venom contained at least two hyaluronidase isoforms. This venom demonstrated lysis of both HA and CS substrates at 41 and 43 kDa. These authors also showed, using biochemical assays, that the hyaluronidases from this venom are pH-dependent endo- $\beta$ -N-acetyl-D-hexosaminidase hydrolases. *L. intermedia* venom was also able to degrade HA in rabbit skin (da Silveira et al., 2007c). A proteomic study also corroborated the presence of hyaluronidases in Loxosceles venoms (dos Santos et al., 2009).

Analyzing the transcriptome of *L. laeta*, Fernandes-Pedrosa et al. (2008) found 4 clones within 1 cluster with similarity to the hyaluronidase from *Bos taurus* (gbjAAP55713.1), which represented 0.13% of the total transcriptome. In addition, Gremski et al. (2010) demonstrated a unique partial sequence in the *L. intermedia* transcriptome with similarity to hyaluronoglucosaminidase 1 from *Rattus norvegicus* (gbjEDL77243.1). Recently, the first recombinant hyaluronidase from the Loxosceles venom was produced from *L. intermedia* venom gland cDNA (Dietrich's Hyaluronidase). The recombinant toxin was expressed in *E. coli* and had a molecular mass of approximately 45 kDa. Hyaluronidase activity of this recombinant toxin was detected on HA and CS after refolding in vitro. An assessment of dermonecrosis in vivo showed that Dietrich's Hyaluronidase increased the macroscopic erythema, ecchymosis and dermonecrotic effect induced by the recombinant dermonecrotic toxin (LiRecDT1) a phospholipase D homologue in rabbit skin. This work confirmed the hypothesis that hyaluronidase acts as a spreading factor in Loxosceles venoms (Ferrer et al., 2013).

HA levels are markedly increased during embryogenesis, inflammation, malignant transformation, and wound healing and whenever fast tissue turnover and remodeling is required. The occurrence of various diseases related to HA metabolism suggest that the level of HA must be tightly controlled (Markovic-Housley et al., 2000; Girish and Kemparaju, 2007). The process of degradation of glycosaminoglycans from connective tissues is related to bacterial pathogenesis, the spread of toxins and venoms, fertilization processes, and cancer progression (Hynes and Walton, 2000; Girish et al., 2004; Girish and Kemparaju, 2007; Lokeshwar and Selzer, 2008). Therefore, the identification and characterization of hyaluronidase inhibitors could be important in the development of new drugs and biotechnological tools to be applied in the above-mentioned fields (Botzki et al., 2004; Barla et al., 2009).

### 7.3. Serine proteases

Serine proteases were first identified in Loxosceles venom as zymogens activated by trypsin (Veiga et al., 2000a). In Veiga et al. (2000a), using zymography assays with venom previously incubated with exogenous proteases, trypsin was shown to activate two gelatinolytic molecules of 85 and 95 kDa in *L. intermedia* venom. Among the various protease inhibitors assayed, only serine protease inhibitors were able to inactivate these enzymes. The activity of the assayed *L. intermedia* serine proteases were optimal in a pH range of 7.0–8.0, and no enzymatic activity was observed on hemoglobin, immunoglobulin, albumin, fibrinogen or laminin, suggesting the specificity of their proteolytic actions.

At the time, no previous descriptions of proteases that behaved as zymogens had been described for spider venoms. However, as this feature had already been reported for several snake venom proteases, the authors suggested that trypsin treatment could specifically degrade the pro-peptide domains of the zymogen molecules and release the active proteases. As this activation was only observed after treatment with trypsin, even though various proteases were assayed, it was suggested that the hydrolysis of zymogen molecules of *L. intermedia* serine proteases was specific because trypsin hydrolyzes peptide bonds immediately after a lysine or arginine (Veiga et al., 2000a).

Consistent with the results of the Veiga et al. (2000a) study, Machado et al. (2005) also found high molecular mass proteins at 85–95 kDa in 2-DE gels. These protein spots were also detected in *L. laeta* and *L. gaucho* venoms.

The transcriptome analysis of the *L. laeta* venom gland revealed twelve clusters that grouped fourteen ESTs putatively assigned as serine proteases coding sequences (Fernandes-Pedrosa et al., 2008). All clusters are similar to serine proteases described in arthropods, such as ticks, spiders and crabs. Shortly thereafter, a proteome study of *L. intermedia* venom described five peptide sequences similar to snake venom serine proteases (dos Santos et al., 2009).

A transcriptome analysis of the *L. intermedia* venom gland putatively assigned five transcripts as serine proteases (Gremski et al., 2010). The ESTs were grouped into two clusters with no sequence similarity with each other. One of the sequences significantly aligned with an arthropod serine protease that was most likely synthesized as an inactive precursor (Nene et al., 2007). The other cluster was similar to a serine protease sequence of the spider *Lycosa sigoriensis* venom gland (Gremski et al., 2010; Zhang et al., 2010). As previously mentioned, *L. intermedia* venom demonstrated serine proteolytic activity at two high molecular mass proteins, suggesting that two or more molecules in the venom exhibit these particular characteristics (Veiga et al., 2000a). Thus, it is not surprising that both transcriptome and proteome studies described distinct sequences coding for serine proteases (Fernandes-Pedrosa et al., 2008; dos Santos et al., 2009; Gremski et al., 2010). The latter Loxosceles venom proteome study noted that the serine proteases in venoms have also been related to complement activation (dos Santos et al., 2009). In fact, various studies have related the involvement of complement system factors in the pathological events triggered by

*Loxosceles* venom, such as hemolysis and dermonecrosis (Lane and Youse, 2004; Tambourgi et al., 2005). However, this feature is currently associated specifically with venom phospholipases D.

Venom serine proteases, in addition to their contribution to prey digestion, can play an important role in local tissue destruction and interfere in blood coagulation and fibrinolysis (Veiga et al., 2000a; Kini, 2005; Devaraja et al., 2010). In fact, venom serine proteases may possess thrombin-like, fibrinogenase and plasminogen-activating activities, and they are molecules with the potential to be novel diagnostic or anti-thrombotic agents (Muanpasitporn and Rojnuckarin, 2007). Snake venom serine proteases, in turn, have been used to determine fibrinogen levels in the presence of heparin (Reptilase time, Funk et al., 1971) and to remove fibrinogen in samples for thrombin-dependent tests (Mullin et al., 2000). In addition, recombinant Ancrod, a thrombin-like serine protease from the *Atractodes rhodostoma* viper, improves the outcomes after cerebral stroke in humans (Liu et al., 2011), and Defibrase, from the *Bothrops* spp., is clinically beneficial in ischemic stroke (Guo et al., 2006). Thus, further studies concerning *Loxosceles* serine proteases are imperative for the development of potential novel therapeutic agents.

#### 7.4. Serine protease inhibitors

Proteinaceous inhibitors of proteolytic enzymes comprise the largest group of naturally occurring enzyme inhibitors. Their vast structural diversity is detailed in the MEROPS database of peptidase inhibitors (available in <http://merops.sanger.ac.uk/inhibitors/>). Recent work comprehensively listed 91 families of protease inhibitors grouped based on their homology. Some families of the serine and cysteine protease inhibitors stand out for their high frequency, such as the Kazal and Kunitz-type inhibitor families (e.g., I1 – I3 peptidase inhibitor families), serpins (e.g., I4 peptidase inhibitor family) and cystatins (e.g., I25 peptidase inhibitor family) (Rawlings et al., 2012).

The first report of the presence of protease inhibitors in *Loxosceles* venom glands was made in 2008 by Fernandes-Pedrosa and colleagues, who performed a transcriptome analysis of venom glands of female *L. laeta* spiders. The sequences that matched these molecules were described as “enzymatic inhibitors” and represented 0.6% of the total number of sequences analyzed.

Some transcripts of the *L. laeta* cDNA library are related to serine (or cysteine) protease inhibitors of diverse species, which have been characterized and have been shown to have different functions and activities, such as an *in vitro* anticlotting activity and *in vivo* antithrombotic and anticoagulant activities related to the inhibition of Factor-Xa. A proprotein-convertase (PC) inhibitor sequence of *Brachistotoma lanceolatum* (embjCAD68157.1) was also listed as similar to some of the *L. laeta* ESTs (Bentele et al., 2006; Fernandes-Pedrosa et al., 2008). This serpin, termed B1-Spn1, inhibits the proprotein processing proteases PC1/3 and furin (Bentele et al., 2006). Analyses of some of the ESTs from the *L. laeta* cDNA library revealed a similarity with a cystatin sequence from the tick *Boophilus microplus* (gbjABG36931.1) that was found to inhibit the human

cathepsin L and vitellin degrading cysteine endopeptidase (VTDC). More recently, the venom of the brown spider *L. intermedia* was subjected to proteomic analysis through the MudPIT proteomic strategy, and approximately a dozen peptides were found to be similar to protease inhibitors (dos Santos et al., 2009). Three sequences showed similarity with an inhibitor of *Oryza sativa* from the cystatin super family (P20907) (Kondo et al., 1990; dos Santos et al., 2009). On the other hand, other peptides sequenced in this proteomic analysis are related to the Kunitz-type inhibitors (dos Santos et al., 2009). Finally, the *L. intermedia* proteome revealed some peptides related to an inhibitor from the serpin super family of protease inhibitors (P07385) (dos Santos et al., 2009). Thus, it is possible that *L. intermedia* venom contains proteases inhibitors belonging to different groups (i.e., the serpins, Kunitz-type and cystatin super families).

A transcriptome analysis of the venom glands of *L. intermedia* identified an EST similar to protease inhibitors from the serpin family (Gremski et al., 2010). This EST sequence is related to mammalian and arthropod serpins, such as the human neuroserpin and the *Ambliomma americanum* tick and *Tachyplesus tridentatus* horseshoe crab serpins (Gremski et al., 2010).

The function of protease inhibitors in *L. intermedia* venom has been suggested to be related to the protection of the toxin integrity (dos Santos et al., 2009). Some authors that have described serine protease inhibitors in different venoms (snakes, spiders and scorpions) propose that one of the physiological roles of these molecules is to resist prey proteases to protect their venom protein toxins (Zupunski et al., 2003; Yuan et al., 2008; Zhao et al., 2011). In addition, these inhibitors may generate a synergistic effect with other neurotoxins, as suggested by other authors (Yuan et al., 2008; Zhao et al., 2011). Because the proteases are involved in several physiological processes, they represent excellent therapeutic targets. Thus, the protease inhibitors arising from venoms are potential candidates to mediate certain biological processes. The Kunitz-type protease inhibitor isolated from *Pseudonaja textilis* venom, textilinin-1, was submitted to a preclinical developmental program and has been shown to be equally effective as aprotinin, an anti-fibrinolytic agent that reduces the blood loss associated with cardiac surgery, but with an enhanced safety profile (Flight et al., 2005).

Certain serpins are able to reduce the excess protease activity and consequent damage associated with inflammatory diseases. SERP1 from the myxoma poxvirus, for example, inhibits human coagulation and fibrinolytic proteases and has been shown to have potent anti-inflammatory effects in the treatment of human inflammatory diseases induced by vascular injuries. Therefore, *Loxosceles* protease inhibitors emerge as compounds with potential therapeutic and biotechnological applications, which, in turn, depend on the further characterization of their biochemical and biological features.

#### 7.5. Venom allergen

Hypersensitivity reactions from arthropod stings include immediate reactions, such as local swelling,



generalized urticaria and anaphylaxis. The pathogenesis is, in many cases, most likely an IgE-mediated reaction. Delayed reactions are also possible, for example, local papules or bullous, hemorrhagic reactions, disseminated papules, generalized papular urticaria and general systemic symptoms, such as fever, myalgia and lymphadenopathy. In some studies, deposits of complement components and immunoglobulins have also been found (Arlian, 2002; Bircher, 2005).

With the exception of bee and wasp venom allergies, the immediate type allergic reactions to arthropod stings and bites, such as mosquitoes, flies, ticks, moths, caterpillars and spiders, are rare (Bircher, 2005). Indeed, allergic reactions to the *Loxosceles* genus have been postulated in only a few cases (Donepudi et al., 2005; Robb et al., 2007; Makris et al., 2009; Lane et al., 2011). In approximately 25% of the published loxoscelism cases, a fine macular or papular eruption develops over the entire body (Pippirs et al., 2009). Cases of AGEF (Acute Generalized Exanthematous Pustulosis) following bites by *L. reclusa* and *L. rufescens* have also been reported (Makris et al., 2009; Lane et al., 2011).

The pathogenesis of AGEF is not clear, but it is a rare and severe cutaneous reaction usually triggered by drugs and viruses (Makris et al., 2009). Of note, several studies have shown that *Loxosceles* venom stimulates the release of large amounts of IL-8 and GM-CSF, in addition to other cytokines, such as the growth-related oncogene and protein-1 (Gomez et al., 1999). This release of IL-8 and GM-CSF could contribute to the development of AGEF following *Loxosceles* envenomation (Lane et al., 2011). In addition, the ability of this venom to evoke inflammatory events was partially reduced in compound 48/80 –pretreated animals, suggesting that mast cells may be involved in these responses. Pre-treating mice with receptor antagonists of histamine (prometazine and cetirizine) and of serotonin (methysergide) significantly attenuated the edema and vascular permeability induced by toxins (Paludo et al., 2009).

Corroborating the hypothesis that *Loxosceles* venom may cause allergic reactions, two transcriptome studies on *Loxosceles* venom glands found sequences similar to allergen-like toxins from other venoms. In the case of *L. laeta*, transcripts similar to venom allergen III (spjP35779jVA3\_SOLRI) represented 0.6% of the total sequences. The similarity of the putative amino acid sequence of an allergen from *L. laeta* with known venom allergen III sequences includes the presence of conserved cysteine residues (Fernandes-Pedrosa et al., 2008). Data from work with the cDNAs of the *L. intermedia* venom gland showed that some messages encode for venom allergens that are cysteine-rich molecules. These RNA messages are poorly expressed: two ESTs are grouped in one cluster representing 0.2% of the toxin-encoding transcripts. These transcripts putatively encode for allergens that show significant similarity to allergens from another spider genus (*Lycosa sigoriensis*), scorpion species (*Opisthacanthus cayanporum*) and some mite allergens (*Ixodes scapularis* and *Argas monolakensis*) (Gremski et al., 2010). In addition, an *L. intermedia* venom proteomic study also reported the presence of a putative allergenic protein similar to a mite allergen (dos Santos et al., 2009).

Some of the allergens have been characterized, and a few of them have been synthesized through recombinant techniques (Bircher, 2005). An isoform of a recombinant allergen from *L. intermedia* venom was cloned and had a calculated molecular mass of approximately 46.2 kDa and a predicted hydrophobic import signal (24 residues) to the endoplasmic reticulum (Ferrer, V.P. and de Mari, T.L. personal communication, 2013). With the availability of allergen sequences and purified recombinant allergens, allergen-specific cellular immune responses were investigated, and in vivo animal models based on defined and clinically relevant allergens were established (Valenta et al., 2011). In this context, the crystal structures from some recombinant allergens derived from insect venoms (wasps, bees, and fire ants) have been important in the search for specific or cross-reacted epitopes (Henriksen et al., 2001; Hoffman, 2008; Padavattan et al., 2008; Borer et al., 2012). Additionally, recombinant allergens were applied for in vivo provocation testing in allergic patients with the aim of comparing their biological activity to natural allergens and to explore their usefulness for in vivo diagnosis (Schmid-Grendelmeier and Cramer, 2001; van Hage-Hamsten and Pauli, 2004). These studies confirmed the biological equivalence of most of the recombinant allergen preparations with the corresponding natural allergens, indicating that the recombinant allergens can substitute for natural allergen extracts for in vivo applications (Valenta et al., 2011). In this way, the allergen-like toxin from *L. intermedia* venom may be a useful tool for investigating the underlying mechanisms of allergic responses following spider bites involving this venom and might serve biomedical purposes in this area.

## 8. Modulation of cell and tissue structures by brown spider venom toxins

Brown spider venom toxins have been implicated in a number of histological changes following spider bites or experimental envenomation under laboratory conditions (Ospedal et al., 2002; da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Swanson and Vetter, 2006). The first and most characteristic tissue/cellular changes observed after brown spider venom exposure is the massive infiltration of inflammatory cells into the dermis and the generation of inflammatory mediators near the bite site or toxin injection (Ospedal et al., 2002; Domingos et al., 2003; Barbaro et al., 2010). Recombinant brown spider phospholipases D reproduce the above-mentioned histological changes (Chaim et al., 2006; da Silveira et al., 2006, 2007b; Ribeiro et al., 2007; Appel et al., 2008).

Although the modulation of leukocyte activity is demonstrated by the massive infiltration of skin structures, *Loxosceles* venom apparently has no direct stimulatory effects on leukocytes in culture, and leukocyte activation represents an indirect effect triggered by the endothelial cells of blood vessels exposed to the venom toxins. This hypothesis is supported by data from cell culture assays using human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) treated with *L. reclusa* crude venom. The results pointed to a potent endothelial cell agonist activity of the venom, which stimulated the endothelial cell expression of E-

selectin and the secretion of the granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-8, which resulted in a dysregulated inflammatory response (Patel et al., 1994). The treatment of HUVEC with *L. deserta* crude venom leads to the expression of a growth-related oncogene and to the synthesis and secretion of the monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 (Desai et al., 1999; Gomez et al., 1999). In addition, *L. deserta* venom evokes the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human keratinocytes (Desai et al., 2000), suggesting that VEGF may contribute to the endothelial activation observed after brown spider envenomation. Additional data from histopathological findings revealed that *L. intermedia* venom acts in vivo (intradermally injected) on rabbit vessel endothelial cells, which causes an endothelial-leukocyte adhesion, a massive transmigration of leukocytes across the endothelium, vessel instability, the degeneration of blood vessels and vascular leakage (Veiga et al., 2001b; Ospedal et al., 2002; Zanetti et al., 2002). Exposing cultured rabbit aorta endothelial cells (RAEC) to *L. intermedia* crude venom evokes the disadhesion of the cells and the degradation of heparan-sulfate proteoglycans, nidogen/entactin and fibronectin (Veiga et al., 2001a; Paludo et al., 2006). Moreover, the direct binding of the venom toxins on the endothelial cell surface has also been reported, which induces drastic morphological changes (Paludo et al., 2006). These data are supported by the internalization of the toxins following endothelial cell treatment with the *L. intermedia* crude venom, the involvement of endocytic vesicles and the final homing of toxins to lysosomes, culminating in cell death by anoikis (Nowatzki et al., 2010).

The direct binding of a recombinant *L. intermedia* phospholipase D on the surface of RAEC has also been reported, as well as the catalytic activity of this toxin to degrade RAEC membrane detergent-extracts, which generates important bioactive lipids and cell morphological changes (Chaim et al., 2011b). Additionally, by using cultured human fibroblasts exposed to a recombinant phospholipase D isoform from the *L. reclusa* venom, an upregulation of the human cytokines genes IL-6, IL-8, CXCL1, CXCL2 that are important inflammatory activators has been demonstrated (Dragulev et al., 2007). The authors postulated that together with the endothelia, the fibroblasts in the dermis also mediate the dysregulated leukocyte activation involved in dermonecrosis and are an additional cellular target for the venom toxins.

Other cells targeted by *Loxosceles* venom toxins are erythrocytes. The hemolytic activity evoked by *Loxosceles* venom was first demonstrated using clinical and laboratory observations from spider bite victims, some of which had a lethal outcome. These observations included elevated creatine kinase levels, hemoglobinuria, bilirubinuria, proteinuria, jaundice, acute hemolytic anemia, reticulocytosis, and shock (Lung and Mallory, 2000; França et al., 2002; Zambrano et al., 2005; de Souza et al., 2008; McDade et al., 2010; Malaque et al., 2011). The hemolytic activity is a conserved event because it has also been reported for the *L. similis*, *L. gaucho*, *L. laeta*, *L. reclusa* and *L. intermedia* venoms (da Silva et al., 2004; Silvestre et al., 2005; Zambrano et al., 2005; McDade et al., 2010; Malaque et al., 2011). The lysis of erythrocytes is associated with

two distinct mechanisms, which are defined as direct (Chaves-Moreira et al., 2009, 2011) and complement-dependent hemolysis (Tambourgi et al., 2002, 2005, 2007; Pretel et al., 2005). Various studies have already reported that spider envenomation induces the activation of the alternative complement pathway facilitating complement-mediated hemolysis (da Silva et al., 2004; Swanson and Vetter, 2006). Tambourgi et al. (2002, 2005) evaluated the mechanism of hemolysis caused by *L. intermedia* venom and proposed the involvement of phospholipases D in the activation of an endogenous metalloprotease, which then cleaves glycophorins and causes erythrocyte susceptibility to lysis by human complement. In another study, the functional changes of rabbit erythrocytes were described following exposure to *L. gaucho* crude venom. The results pointed to an alteration of red cell function using an osmotic fragility test and greater deformability after venom exposure (Barretto et al., 2007).

Chaves-Moreira et al. (2009) compared the hemolytic activities of a recombinant active phospholipase D from *L. intermedia* venom (LiRecDT1) (Chaim et al., 2006) and its mutated version (LiRecDT1H12A) (Kusma et al., 2008). They demonstrated the involvement of a direct molecular mechanism dependent on the catalytic activity of phospholipase D in hemolysis, strengthening previous data that reported the participation of dermonecrotic toxins in red blood cell lysis. Furthermore, the metabolism of membrane phospholipids, such as sphingomyelin and lysophosphatidylcholine, and the influx of calcium mediated by an L-type channel in human erythrocytes have been shown to be involved in hemolysis (Chaves-Moreira et al., 2011).

Along with erythrocytes, platelets represent another target of brown spider venom. Data indicating platelets as a target were first described in biopsies of animal models exposed to crude venom, which reported the intravascular coagulation and thrombosis inside the dermal blood vessels. The hypothesis of platelet involvement is also strengthened by the findings of the infiltration and aggregation of inflammatory cells in the generated thrombus. In addition, clinical laboratory analysis of envenomed victims often reveals thrombocytopenia (Ospedal et al., 2002; da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Swanson and Vetter, 2006). Cellular changes in the bone marrow and peripheral blood of rabbits caused by *L. intermedia* venom include the marrow depression of megakaryocytes correlated with the thrombocytopenia in the peripheral blood observed in the early envenomation (da Silva et al., 2003). Similar results were reported by using *L. gaucho* venom, where a decrease in the platelet count in rabbit peripheral blood after venom and/or purified phospholipase D exposure, without platelet aggregation and no signs of platelet lysis, was observed. The activation of platelets after venom exposure is supported by the increased expression of ligand-induced binding site 1 and P-selectin (Tavares et al., 2004, 2011).

By studying recombinant venom phospholipases D and using human platelet-rich plasma, in vitro platelet aggregation activity has been reported (da Silveira et al., 2006, 2007b; Appel et al., 2008), strengthening the hypothesis of venom activity on platelets. However, the molecular pathway by which the toxins cause platelet aggregation is



not fully understood. In the case of phospholipases D, catalysis involvement is expected, such that it would generate a broad range of bioactive lipids on the platelet membrane and finally inducing aggregation.

Renal structures and kidney cells represent other targets for brown spider venom toxins. Renal injury was previously described in clinical and laboratory data from injured patients (da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Swanson and Vetter, 2006). Clinical case reports have indicated a direct correlation of renal damage and hemolysis induced by different *Loxosceles* venoms (Zambrano et al., 2005; Abdulkader et al., 2008; de Souza et al., 2008; Hubbard and James, 2011; Malaque et al., 2011). By studying experimental-induced kidney injury in rats exposed to *L. gaucho* crude venom, Lucato et al. (2011) concluded that this acute injury was a consequence of the impaired renal blood flow associated with the systemic rhabdomyolysis. Nevertheless, animal models or cultured MDCK epithelial cells exposed to *L. intermedia* crude venom or a recombinant phospholipase D have also provided evidence for a direct renal cytotoxicity (Luciano et al., 2004; Chaim et al., 2006; Kusma et al., 2008). Using mice exposed to a recombinant phospholipase D and a mutated isoform exhibiting decreased phospholipase activity, it has been shown that in vivo nephrotoxicity and in vitro MDCK cytotoxicity depends on the catalytic activity of the phospholipases (Kusma et al., 2008).

The activities of *Loxosceles* venom have also been demonstrated in other tissues and organs, such as the heart and liver. Dias-Lopes et al. (2010) showed cardiotoxic effects in mice administered *L. intermedia* venom. These effects were observed through the increase of the levels of markers associated with heart lesions, indicating that the venom antigens can reach the heart tissue and, thus, lead to cardiac dysfunction. Christoff et al. (2008) reported changes in histological and biochemical aspects of the liver in rats injected with *L. intermedia* crude venom. In the venom-treated group, the plasma levels of enzymes, such as alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, gamma-glutamyl-transferase and lactate dehydrogenase, increased. Furthermore, histopathological changes indicating hepatic lesions were also observed.

Finally, the extracellular matrix and associated constituents represent a key histological structure targeted by *Loxosceles* venom toxins, as observed by the histopathological findings of hemorrhage into the dermis at the bite site, fibrin deposition inside the blood vessels, defective wound healing after bites, gravitational lesion spreading and the systemic dissemination of toxins (da Silva et al., 2004; Swanson and Vetter, 2006). Previous work also described the proteolytic activities of *L. intermedia* venom on gelatin, fibronectin and fibrinogen (Feitosa et al., 1998; Veiga et al., 2001a; Zanetti et al., 2002; Paludo et al., 2006), the disruption of EHS basement structures, the degradation of entactin/nidogen and the hydrolysis of heparan sulfate proteoglycan from endothelial cells (Veiga et al., 2001a, b) and more recently the involvement of a hyaluronidase in the noxious activity of venom (Ferrer et al., 2013) (See topic 7.2).

## 9. *Loxosceles* spider toxin immunology and perspectives for development of a new generation of antivenoms

Spiders and other venomous animals contain a complex mixture of biologically active substances developed to block the vital physiological and biochemical functions of the victims. Antidotes prepared from animal anti-sera are effective against all species of *Loxosceles* spiders; these antivenoms are less complex than other spider or snake antivenoms because the major toxic components of these spider venoms are proteins known as dermonecrotic toxins, sphingomyelinases D (SMases D), the phospholipase D family and Loxtox proteins (Kalapothakis et al., 2007; Binford et al., 2009; Wood et al., 2009). Although significant progress has been made in immunological studies of these groups of toxins, few medical and university centers are dedicated to this subject of research. Novel approaches based on epitopes and mimotopes selected from microarray peptides (Spot-synthesis) or from phage-displayed random peptide libraries have generated information sufficient to develop a new generation of antivenoms for therapeutic or vaccines purposes. The immunological investigation of the phospholipase D of *Loxosceles* spiders was mainly performed with LiD1, a dermonecrotic toxin from the venom of the *L. intermedia*, by Chávez-Olortegui and his collaborators (Kalapothakis et al., 2002; Araújo et al., 2003; Felicori et al., 2006, 2009; Dias-Lopes et al., 2010). The cDNA encoding this protein was shown to display a similarity with the genes of the known *Loxosceles* phospholipase D toxins (Kalapothakis et al., 2007). The recombinant protein rLiD1 was strongly recognized by anti-*L. intermedia* crude venom and was also able to generate reactive antibodies against the native dermonecrotic proteins and whole *L. intermedia* venom. Using these antibodies and overlapping synthetic peptides covering the whole (LiD1) sequence, regions with an epitope function were revealed. The N-terminal (residues 13–27), central (residues 31–45, 58–72, 100–114, and 160–174) and C-terminal (residues 247–261) parts of the protein have been shown to contain continuous epitopes with neutralizing potential. The antibodies elicited by these epitopes were found to protect against the dermonecrotic-, hemorrhagic- and edema-forming activities induced by LiD1 and whole venom. To visualize the three-dimensional position of the experimentally determined epitopes, the LiD1 protein was modeled by homology using the solved structure of phospholipase D from *L. laeta* as a template. The localization of the epitopes in the context of the three-dimensional structure of the dermonecrotic protein is shown in Fig. 8. As shown, most of epitope regions determined were localized in the  $\alpha$ -helix-loop regions. However, 3 of the 8  $\alpha$ -helix regions were not antigenic (Felicori et al., 2009).

Studies using monoclonal antibodies raised against the toxins of the *L. intermedia* whole venom revealed that one antibody (LimAb7) recognized several venom proteins, including LiD1 (Alvarenga et al., 2003). Because LimAb7 reacts with rLiD1, the LiD1 epitope recognized by LimAb7 was mapped. None of the overlapping peptides that

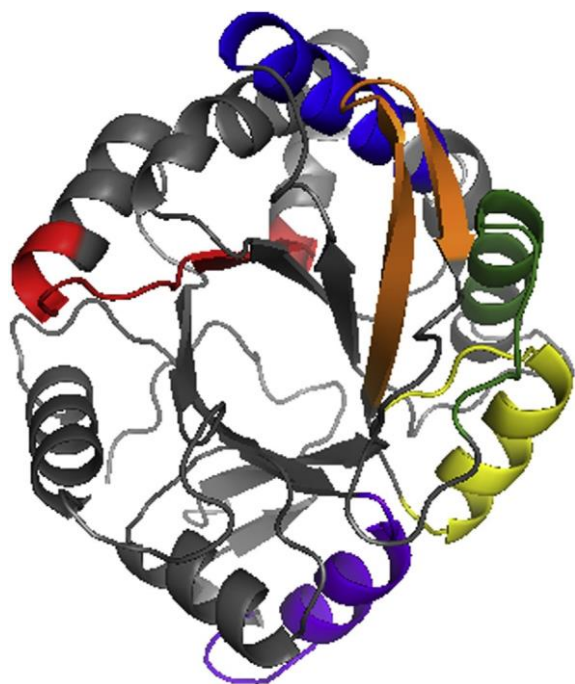


Fig. 8. LiD1 structural model indicating the position of the selected epitopes that reacted with the horse anti-*L. intermedia* venom serum. In yellow, the N-terminal epitope (residues 13–27); in orange, the central epitope (residues 31–45); in green, the central epitope (residues 58–72); in blue, the central epitope (residues 100–114); in red, the central epitope (residues 160–174); and in purple, the C-terminal epitope (residues 247–261). Figure color codes refer to the on-line images. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

covered the sequence of LiD1 were recognized, indicating that the epitope is not continuous but rather, discontinuous (de Moura et al., 2011). Consequently, the phage-display technique was used, and this method allowed for the identification of mimotopes without homology between the amino acid sequences of the phage-selected peptides and the sequence of LiD1 (de Moura et al., 2011). The potential epitope regions in LiD1 based on the amino acid sequences of the selected mimotopes and on the 3D LiD1 protein model were predicted, and the MIMOP residues C<sup>197</sup>, Y<sup>224</sup>, W<sup>225</sup>, T<sup>226</sup>, D<sup>228</sup>, K<sup>229</sup>, R<sup>230</sup>, T<sup>232</sup> and Y<sup>248</sup> were identified as being the putative epitope bound by LimAb7 (de Moura et al., 2011).

In a recent study, a chimeric protein (rCpLi) expressing the epitopes of LiD1 previously defined as residues 25–51 and 58–72 and a conformational epitope identified by the phage display technique were generated by cloning the respective synthetic genes in a pET 26b vector. ELISA and immunoblot assays revealed that the mini-protein displayed antigenic activity against the antibodies of the anti-individual epitopes. Anti-*Loxosceles* sp. crude venoms also reacted with rCpLi. Because the protein is non-toxic, it is considered to be an important immunogen target for vaccines against this dangerous regional spider (Mendes et al., 2013).

## 10. Biotechnological use of brown spider venom components

Spider venoms are mixtures of several hundred biologically active proteins, glycoproteins and peptides that act synergistically as an adaptation to defend against predators and to paralyze and kill insect prey. Because these toxins are active on different cells and tissue structures and effectively modulate distinct physiological responses in insects and vertebrates, they are potential models to study the design of pharmacological tools, drugs and/or biochemical, immunological and cell biology reagents.

The first biotechnological application of brown spider venom constituents consisted of the antiserum-based products used for the therapy of spider bite victims. For example, anti-arachnid serum (obtained using the venom of *L. gaucho*) was produced by the Butantan Institute, São Paulo, Brazil; anti-*Loxosceles* serum using the *L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta* crude venoms was produced by the Production Center of Immunobiologic Products, Paraná, Brazil; and anti-*Loxosceles* serum raised against *L. laeta* venom was produced by the National Institute of Health (Peru) (Roodt et al., 2002; da Silva et al., 2004; Pauli et al., 2009). With the recombinant brown spider venom toxins available, a new generation of loxoscelic antiserum could be produced directly by using the antigenic active recombinant toxins from different *Loxosceles* species or by enriching the crude venom with biologically active recombinant molecules to increase antibody production and venom neutralization. In fact, a recombinant phospholipase D was used to produce an anti-*Loxosceles* serum that was able to neutralize the toxic effects induced mainly by the *L. intermedia* and *L. laeta* or slightly weaker the activity of *L. gaucho* venoms (de Almeida et al., 2008). Additional recombinant antigens should be used as antigenic sources for vaccines or antivenom development (See topic 10).

Another *Loxosceles* venom-based product is named ARACHnase (Hemostasis Diagnostics International Co., Denver, CO, USA). It consists of plasma containing *L. reclusa* crude venom that mimics the presence of a lupus anticoagulant and should be a useful positive control for lupus anticoagulant testing (McGlasson et al., 1993).

Based on their properties, brown spider recombinant phospholipases D could be used as putative models for the application in the different areas of cell biology, immunology, pharmacology and biochemistry. They can be used, for example, as reagents for biochemical lipid research protocols by generating bioactive lipids, such as ceramide-1-phosphate from the hydrolysis of sphingomyelin and lysophosphatidic acid from the hydrolysis of lysoglycerophospholipids (Lee and Lynch, 2005; Chaim et al., 2011b). In addition, they may be applied in cell biology studies that investigate the biological activities triggered by ceramide-1-phosphate, lysophosphatidic acid and their derived molecules, such as the control of cell proliferation, death, differentiation and migration (Anliker and Chun, 2004; Chalfant and Spiegel, 2005). *Loxosceles* recombinant phospholipases D or mutated isoforms (Kusma et al., 2008; Chaim et al., 2011b; Mendes et al., 2013) could also be used as immunological adjuvant molecules for stimulating

immunogenicity because they can modulate inflammation and stimulate the production of cytokines in different cell models. Recombinant phospholipases D could be used as standard laboratory reagents to investigate platelet aggregation, platelet receptor(s), and related molecular pathways. In addition, these recombinant proteins could be used as reagents to induce hemolysis, possibly establishing a new model of hemolysis dependent on phospholipase D and bioactive lipids. Furthermore, recombinant phospholipases D could be used as reagents applied in the diagnosis of loxoscelism because a clinical laboratory diagnosis is currently unavailable. Because brown spider venom phospholipases D are strong antigenic molecules and are highly expressed molecules in crude venom (Ribeiro et al., 2007; Gremski et al., 2010; Wille et al., 2013), recombinant phospholipases D could be used as antigens for generating polyclonal or monoclonal antibodies for the diagnosis of Loxoscelism (de Moura et al., 2011).

ICK peptides have been studied as potential insecticidal bioactive toxin molecules, and recombinant brown spider ICK toxins (Matsubara et al., 2013) could be used as substitutes for chemical defense products as well as in transgenic agricultural models, if further studies show that they specifically act upon insect channels. In addition, brown spider ICK peptides could also be useful reagents to probe ion channel structures and functions, as previously described for other similar molecules (Dutertre and Lewis, 2010; Klint et al., 2012).

Recombinant *Loxosceles* hyaluronidase (Ferrer et al., 2013) could be used as a reagent in the biochemical studies of glycosaminoglycan hydrolases and as a tool to design specific inhibitors to reduce the spread of venom and toxins retaining the activity of native hyaluronidases. Moreover, because hyaluronidases are involved in bacterial pathogenesis, fertilization, and cancer progression, recombinant brown spider hyaluronidase could be utilized to generate hyaluronidase inhibitors that regulate several pathological events involving the balance between the anabolism and catabolism of HA. Finally, it could be used as an adjuvant molecule to increase drug absorption through increased tissue permeabilization (da Silveira et al., 2007c; Ferrer et al., 2013).

Recombinant brown spider venom astacins (da Silveira et al., 2007a; Trevisan-Silva et al., 2010) could be used as tools in the study of extracellular matrix remodeling, for the generation of proteolytic inhibitors and as direct thrombolytic agents for the treatment of vascular diseases.

Finally, other brown spider venom constituents also have putative biological applications. These include serine protease inhibitors, which could be useful agents for the investigation of general proteolysis, and recombinant TCTP (Sade et al., 2012), which could be used to study tumor cell behavior in experimental oncology, to study cell proliferation mechanisms, in the screening of anticancer drugs and as a model for allergy screening. Recently, the N-terminal fragment of TCTP (MIYRDLISH) was shown to function as a Protein Transduction Domain (PTD), which is cell-penetrating peptide. This new feature of TCTP is being studied in drug delivery systems development (Maeng et al., 2013). Detailed data on the putative

biotechnological use of brown spider venom toxins have been provided in Senff-Ribeiro et al. (2008) and Chaim et al. (2011a).

## 11. Future directions

Although many scientific studies have been published in recent years examining the brown spider venom and loxoscelism that have brought insights and improved the knowledge base regarding these topics, there are several opened questions still to be answered, and the challenges and opportunities for researchers are enormous. The use of combined data from molecular biology techniques, bioinformatics, proteomic studies, transcriptome analysis, and the expression of recombinant toxins will open great possibilities in this field.

The challenges concerning brown spiders and loxoscelism can be divided into clinical and basic research. The first clinical challenge is the production of a new generation of antisera using purified recombinant brown spider bioactive and antigenic competent toxins individually or by enriching crude venoms with recombinant toxins. Such antisera would be monospecific and may be used at lower doses, thereby decreasing the deleterious side effects of serum therapy, but with the same or higher efficiency in neutralizing the noxious venom activities.

A second clinical challenge hinges on the improvement of treatment of the injured victims. Currently, loxoscelism treatment is empirical and based on clinical signs, as described above (topic 4). A molecular comprehension of brown spider venoms and the mechanism by which the toxins trigger their effects, together by obtaining recombinant toxins and toxin 3D structural/biological data, will open to the possibility of a rational design of synthetic inhibitors directed at the specific venom toxins involved in the local and systemic effects. In addition, inhibitors for the receptors or cellular molecules involved in the metabolism of the bioactive lipid mediators generated by phospholipases D could also produce novel and powerful tools for the treatment of loxoscelism. Another clinical hurdle is the development of a clinical, in vitro diagnostic for loxoscelism with the sensitivity and specificity for different brown spider species. This diagnostic would be based on low-invasive molecular biology techniques and would provide sensitivity and specificity for different brown spider species using blood or even urine taken from exposed victims.

Finally, because loxoscelism is a public health problem around the world, the development of rational biological control methods, which are currently not available, is necessary to decrease the number of spiders and domiciliary infestations in the endemic regions. Similar methods are currently used for agricultural plagues, utilizing bacteria, fungus or other natural predators (Boyer et al., 2012; Lockett et al., 2012) to replace the pesticides currently used as a nonspecific biological control method and which cause environmental and human hazards.

The future of basic research on brown spider venoms and/or loxoscelism represents a remarkable challenge. Although considerable growth in this field has occurred, a great number of molecules in brown spider venoms remain



unidentified or their biological effects and mechanisms have not been described, especially for toxins with low level of expression and/or novel toxin isoforms of previously described. In addition, a genomic project focusing on *Loxosceles* species is a rational future direction that will bring novel insights for brown spider biology and loxoscelism and that will create access for several novel research tools.

Another current challenge for the brown spider venom toxinologist is the access to purified recombinant toxins in models other than bacteria. Currently, all recombinant brown spider venom toxins obtained have been produced in bacteria, an inexpensive expression model system that is simple to manipulate. However, because it does not generate co- and post-translational modifications, such as N-glycosylation and disulfide bonds, bacteria model systems often produce recombinant molecules in their unfolded form, with incorrect conformations, water insolubility, and with no biological function. The synthesis of brown spider venom recombinant toxins using alternative expression models with additional features that optimize and refine this process, such as the yeast *Pichia pastoris*, the insect *Drosophila Schneider* cells and mammalian systems, is an immediate challenge.

Another future direction is to obtain native brown spider venom toxins by developing primary cultures of the venom secretory cells. Similar approaches have been successfully established for other venomous animals. Examples include culturing the secretory cells from the venom glands of snakes *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* (Duarte et al., 1999; Yamanouye et al., 2007) and from the *Phoneutria nigriventer* spider (Silva et al., 2008). These cultures could produce and secrete sufficient amounts of native toxins to be useful for biological and biotechnological evaluation. The use of mass spectrometry analysis and other proteomic protocols, such as 2-DE, N-terminal amino acid sequencing and high efficiency chromatography, provide great promise for detailed studies of brown spider venoms and hemolymph proteins and peptides. To date, only two studies have addressed this topic: Machado et al. (2005) described eleven isoforms of the phospholipase D toxin in *L. gaucho* venom, and dos Santos et al. (2009) identified 39 proteins in *L. intermedia* venom. There are no reports of this type of study for hemolymph.

Additionally, in the near future, novel data will provide information related to the tridimensional toxin structures, which will require the experimental co-crystallization of putative ligands or substrates to recombinant toxins. The tridimensional analysis of brown spider venom toxins will be critical to elucidate the location of the catalytic sites and sites that interact with natural substrates or ligands, and especially to show how the toxins interact with cell structures. These analyses will allow for the development of synthetic ligands, analogs, or inhibitors.

Finally, an attractive and practically unknown model for studying *Loxosceles* spiders is the analysis of hemolymph contents and its relationship to venom toxins and loxoscelism. From such analysis, natural inhibitors and/or other important molecules could be discovered, which would add great value to the field of toxinology.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the CAPES, CNPq, FAPESP, FAPEMIG, INCTTOX, Fundação Araucária-Paraná and Secretaria de Tecnologia e Ensino Superior do Paraná, SETI-PR, Brasil.

## Conflict of interest statement

None.

## References

- Abdulkader, R.C., Barbaro, K.C., Barros, E.J., Burdmann, E.A., 2008. Nephrotoxicity of insect and spider venoms in Latin America. *Semin. Nephrol.* 28, 373–382.
- Akdeniz, S., Green, J.A., Stoecker, W.V., Gomez, H.F., Keklikci, S.U., 2007. diagnosis of loxoscelism in two turkish patients confirmed with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and non-invasive tissue sampling. *Dermatol. Online J.* 13, 11.
- Alvarenga, L.M., Martins, M.S., Moura, J.F., Kalapothakis, E., Oliveira, J.C., Mangili, O.C., Granier, C., Chávez-Olortegui, C., 2003. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. *Toxicon* 42, 725–731.
- Amson, R., Pece, S., Marine, J.C., di Fiore, P.P., Telerman, A., 2013a. TPT1/TCTP-regulated pathways in phenotypic reprogramming. *Trends Cell Biol.* 23, 37–46.
- Amson, R., Karp, J.E., Telerman, A., 2013b. Lessons from tumor reversion for cancer treatment. *Curr. Opin. Oncol.* 25, 59–65.
- Amzallag, N., Passer, B.J., Allanic, D., Segura, E., Thery, C., Goud, B., Amson, R., Telerman, A., 2004. TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein/histamine-releasing factor via a nonclassical pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 46104–46112.
- Andersen, R.J., Campoli, J., Johar, S.K., Schumacher, K.A., Allison Jr., E.J., 2011. Suspected brown recluse envenomation: a case report and review of different treatment modalities. *J. Emerg. Med.* 41, 31–37.
- Anlikim, B., Chun, J., 2004. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 279, 20555–20558.
- Appel, M.H., da Silveira, R.B., Gremski, W., Veiga, S.S., 2005. Insights into brown spider and loxoscelism. *Inverteb. Surv. J.* 2, 152–158.
- Appel, M.H., da Silveira, R.B., Chaim, O.M., Paludo, K.S., Trevisan-Silva, D., Chaves-Moreira, D., da Silva, P.H., Mangili, O.C., Senff-Ribeiro, A., Gremski, W., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2008. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 167–178.
- Araújo, S.C., Castanheira, P., Alvarenga, L.M., Mangili, O.C., Kalapothakis, E., Chávez-Olortegui, C., 2003. Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. *Toxicon* 41, 261–267.
- Araújo, H.R.C., 2009. Ultra-estrutura dos hemócitos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). Dissertação apresentada ao Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, p. 86.
- Arlian, L.G., 2002. Arthropod allergens and human health. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 395–433.
- Bajin, M.S., Arikian, G., Parlak, M., Tuncok, Y., Yigit, N., Durak, I., Saatci, A.O., 2011. Necrotic arachnidism of the eyelid due to *Loxosceles rufescens* spider bite. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 30, 302–305.
- Barbaro, K.C., Cardoso, J.L.C., 2003. Mecanismo de ação do veneno de *Loxosceles* e aspectos clínicos do loxoscelismo. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Fan, H.W., Málague, C.M.S., Haddad Jr., H. (Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes*. Savier, São Paulo, Brasil, pp. 160–174.
- Barbaro, K.C., Knysak, I., Martins, R., Hogan, C., Winkel, K., 2005. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* 45, 489–499.
- Barbaro, K.C., Lira, M.S., Araújo, C.A., Pareja-Santos, A., Távora, B.C.L.F., Prezotto-Neto, J.P., Kimura, L.F., Lima, C., Lopes-Ferreira, M., Santoro, M.L., 2010. Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. *Toxicon* 56, 972–979.
- Barla, F., Higashijima, H., Funai, S., Sugimoto, K., Harada, N., Yamaji, R., Fujita, T., Nakano, Y., Inui, H., 2009. Inhibitive effects of alkyl gallates

- on hyaluronidase and collagenase. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 73, 2335–2337.
- Barretto, O.C., Prestes, K.S., Fonseca, L.K.F., Silveira, P.A.A., 2007. Functional alterations of rabbit erythrocytes induced by *Loxosceles gaucho* venom. *Hum. Exp. Toxicol.* 26, 817–821.
- Bazile, F., Pascal, A., Arnal, I., Le Clainche, C., Chesnel, F., Kubiak, J.Z., 2009. Complex relationship between TCTP, microtubules and actin microfilaments regulates cell shape in normal and cancer cells. *Carcinogenesis* 30, 555–565.
- Brasil, 2001. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Brasília, p. 120.
- Bentele, C., Krüger, O., Tödtmann, U., Oley, M., Ragg, H., 2006. A proprotein convertase-inhibiting serpin with an endoplasmic reticulum targeting signal from *Branchiostoma lanceolatum*, a close relative of vertebrates. *Biochem. J.* 395, 449–456.
- Bertani, R., Fukushima, C.S., Nagahama, R.H., 2010. *Loxosceles chapadensis* (Araneae: Sicariidae): a new recluse spider species of the gaucho group from Brazil. *J. Arachnol.* 38, 364–367.
- Binford, G.J., Wells, M.A., 2003. The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogynae spiders. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 135, 25–33.
- Binford, G.J., Cordes, M.H., Wells, M.A., 2005. Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. *Toxicon* 45, 547–560.
- Binford, G.J., Callahan, M.S., Bodner, M.R., Rynerson, M.R., Núñez, P.B., Ellison, C.E., Duncan, R.P., 2008. Phylogenetic relationships of *Loxosceles* and *Sicariids* spiders are consistent with Western Gondwanan vicariance. *Mol. Phylogenet. Evol.* 48, 538–553.
- Binford, G.J., Bodner, M.R., Cordes, M.H., Baldwin, K.L., Rynerson, M.R., Burns, S.N., Zobel-Thropp, P.A., 2009. Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms. *Mol. Biol. Evol.* 26, 547–566.
- Bircher, A.J., 2005. Systemic immediate allergic reactions to arthropod stings and bites. *Dermatology* 210, 119–127.
- Bommer, U.A., Thiele, B.J., 2004. The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 379–385.
- Bommer, U., 2012. Cellular function and regulation of the translationally controlled tumour protein TCTP. *Open Allergy J.* 5, 19–32.
- Borer, A.S., Wassmann, P., Schmidt, M., Hoffman, D.R., Zhou, J.J., Wright, C., Schirmer, T., Markovic-Housley, Z., 2012. Crystal structure of Sol I 2: a major allergen from fire ant venom. *J. Mol. Biol.* 415, 635–648.
- Botzki, A., Rigden, D.J., Braun, S., Nukui, M., Salmen, S., Hoechstetter, J., Bernhardt, G., Dove, S., Jedrzejak, M.J., Buschauer, 2004. A L-Ascorbic acid 6-hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor: X-ray structure and molecular modeling of enzyme-inhibitor complexes. *J. Biol. Chem.* 279, 45990–45997.
- Boyer, S., Paris, M., Jegou, S., Lemprière, G., Ravanel, P., 2012. Influence of insecticide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* treatments on resistance and enzyme activities in *Aedes rusticus* larvae (Diptera: Culicidae). *Biol. Control* 62, 75–81.
- Bucarechi, F., de Capitani, E.M., Hyslop, S., Sutti, R., Rocha-e-Silva, T.A., Bertani, R., 2010. Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles anomala*. *Clin. Toxicol.* 48, 764–765.
- Burgess, A., Labbe, J.C., Vigneron, S., Bonneaud, N., Strub, J.M., van Dorsselaer, A., Lorca, T., Castro, A., 2008. Chfr interacts and colocalizes with TCTP to the mitotic spindle. *Oncogene* 27, 5554–5566.
- Casewell, N.R., Harrison, R.A., Wüster, W., Wagstaff, S.C., 2009. Comparative venom gland transcriptome surveys of the saw-scaled vipers (Viperidae:Echis) reveal substantial intra family gene diversity and novel venom transcripts. *BMC Genomics* 10, 564.
- Catalan, A., Cortes, W., Sagua, H., Gonzalez, J., Araya, J.E., 2011. Two new phospholipase D isoforms of *Loxosceles laeta*: cloning, heterologous expression, functional characterization, and potential biotechnological application. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 25, 393–403.
- Chaim, O.M., Sade, Y.B., da Silveira, R.B., Toma, L., Kalapothakis, E., Chavez-Olortegui, C., Mangili, O.C., Gremski, W., von Dietrich, C.P., Nader, H.B., Sanches Veiga, S., 2006. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211, 64–77.
- Chaim, O.M., Trevisan-Silva, D., Chaves-Moreira, D., Wille, A.C.M., Ferrer, V.P., Matsubara, F.H., Mangili, O.C., da Silveira, R.B., Gremski, L.H., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2011a. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes. *Toxins* 3, 309–344.
- Chaim, O.M., da Silveira, R.B., Trevisan-Silva, D., Ferrer, V.P., Sade, Y.B., Boia-Ferreira, M., Gremski, L.H., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Takahashi, H.K., Toledo, M.S., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2011b. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. *Biochim. Biophys. Acta* 1811, 84–96.
- Chalfant, C.E., Spiegel, S., 2005. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J. Cell Sci.* 118, 4605–4612.
- Chatzaki, M., Horta, C.C., Almeida, M.O., Pereira, N.B., Mendes, T.M., Dias-Lopes, C., Guimarães, G., Moro, L., Chávez-Olortegui, C., Horta, M.C.R., Kalapothakis, E., 2012. Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom. *Toxicon* 60, 21–30.
- Chaves-Moreira, D., Chaim, O.M., Sade, Y.B., Paludo, K.S., Gremski, L.H., Donatti, L., de Moura, J., Mangili, O.C., Gremski, W., da Silveira, R.B., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2009. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. *J. Cell. Biochem.* 107, 655–666.
- Chaves-Moreira, D., Souza, F.N., Fogaça, R.T.H., Mangili, O.C., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2011. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D. *Toxin. J. Cell. Biochem.* 112, 2529–2540.
- Chen, S.H., Wu, P.S., Chou, C.H., Yan, Y.T., Liu, H., Weng, S.Y., Yang-Yen, H.F., 2007. A knockout mouse approach reveals that TCTP functions as an essential factor for cell proliferation and survival in a tissue- or cell type-specific manner. *Mol. Biol. Cell* 18, 2525–2532.
- Choi, K.W., Hsu, Y.C., 2007. To cease or to proliferate: new insights into TCTP function from a *Drosophila* study. *Cell Adhes. Migr.* 1, 129–130.
- Christoff, A.O., de Oliveira, A., Chaim, O.M., Lugarini, D., Pereira, A.L.B., Paludo, K.S., Telles, J.E.Q., Bracht, A., Veiga, S.S., Acco, A., 2008. Effect of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. *Toxicon* 52, 695–704.
- Cidade, D.A., Simão, T.A., Dávila, A.M., Wagner, G., Junqueira-De-Azevedo, I.L., Ho, P.L., Bon, C., Zingali, R.B., Albano, R.M., 2006. Bothrops jararaca venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. *Toxicon* 48, 437–461.
- Cordes, M.H., Binford, G.J., 2006. Lateral gene transfer of a dermonecrotic toxin between spiders and bacteria. *Bioinformatics* 22, 264–268.
- Corrêa-Netto, C., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Silva, D.A., Ho, P.L., Leitão-de-Araújo, M., Alves, M.L., Sanz, L., Foguel, D., Zingali, R.B., Calvete, J.J., 2011. Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. *J. Proteomics* 74, 1795–1809.
- Corzo, G., Gilles, N., Satake, H., Villegas, E., Dai, L., Nakajima, T., Haupt, J., 2003. Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider *Macrothelegias* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel. *FEBS Lett.* 547, 43–50.
- Craik, D.J., Daly, N.L., Waite, C., 2001. The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. *Toxicon* 39, 43–60.
- Craik, D., Mlyn, J., Daly, N., 2010. Cyclotides: macrocyclic peptides with applications in drug design and agriculture. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 9–16.
- Cramer, K., 2008. Are brown recluse spiders, *Loxosceles reclusa* (Araneae, Sicariidae) scavengers? The influence of predator satiation, prey size and prey quality. *J. Arachnol.* 36, 140–144.
- Cunha, R.B., Barbaro, K.C., Muramatsu, D., Portaro, F.C., Fontes, W., de Sousa, M.V., 2003. Purification and characterization of loxoscelin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucho* brown spider venom. *J. Protein Chem.* 22, 135–146.
- Daly, N.L., Craik, D.J., 2011. Bioactive cystine knot proteins. *Bioactive cystine knot proteins. Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 362–368.
- da Silva, P.H., Hashimoto, Y., Santos, F.A., Mangili, O.C., Gremski, W., Veiga, S.S., 2003. Hematological cell findings in bone marrow and peripheral blood of rabbits after experimental acute exposure to *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* 42, 155–161.
- da Silva, P.H., da Silveira, R.B., Appel, M.H., Mangili, O.C., Gremski, W., Veiga, S.S., 2004. Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon* 44, 693–709.
- da Silveira, R.B., Filho, J.F.S., Mangili, O.C., Veiga, S.S., Gremski, W., Nader, H.B., 2002. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spider. *Toxicon* 40, 815–822.
- da Silveira, R.B., Pigozzo, R.B., Chaim, O.M., Appel, M.H., Dreyfuss, J.L., Toma, L., 2006. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland. *Biochimie* 88, 1241–1253.
- da Silveira, R.B., Wille, A.C.M., Chaim, O.M., Appel, M.H., Silva, D.T., Franco, C.R., 2007a. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochem. J.* 406, 355–363.

- da Silveira, R.B., Pigozzo, R.B., Chaim, O.M., Appel, M.H., Trevisan-Silva, D., Dreyfuss, J.L., 2007b. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. *Biochimie* 89, 289–300.
- da Silveira, R.B., Chaim, O.M., Mangili, O.C., Gremski, W., Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2007c. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon* 49, 758–768.
- de Almeida, D.M., Fernandes-Pedrosa, F.M., de Andrade, R.M., Marcelino, J.R., Gondo-Higashi, H., de Azevedo, I.L.M.J., Ho, P.L., van den Berg, C., Tambourgi, D.V., 2008. A new anti-loxoscelic serum produced against recombinant sphingomyelinase D: results of pre-clinical trials. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 463–470.
- de Castro, C.S., Silvestre, F.G., Araujo, S.C., de Gabriel, M.Y., Mangili, O.C., Cruz, I., Chavez-Olortegui, C., Kalapothakis, E., 2004. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon* 44, 273–280.
- de Giuseppe, P.O., Ullah, A., Trevisan-Silva, D., Gremski, L.H., Wille, A.C.M., Chaves-Moreira, D., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O.M., Murakami, M.T., Veiga, S.S., Arni, R.K., 2011. Structure of a novel class II phospholipase D: catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 622–627.
- de Moura, J., Felicori, L., Moreau, V., Guimarães, G., Dias-Lopes, C., Molina, L., Alvarenga, L.M., Fernandes, P., Frézard, F., Ribeiro, R.R., Fleury, C., Nguyen, C., Molina, F., Granier, C., Chávez-Olortegui, C., 2011. Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. *Vaccine* 29, 7992–8001.
- de Oliveira, K.C., Gonçalves-de-Andrade, R.M., Piazza, R.M.F., Ferreira Jr., J.M.C., van den Berg, C.W., Tambourgi, D.V., 2005. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. *Toxicon* 45, 421–429.
- Desai, A., Miller, M.J., Gomez, H.F., Warren, J.S., 1999. *Loxosceles* deserta spider venom induces NF-kB-dependent chemokine production by endothelial cells. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 37, 447–456.
- Desai, A., Lankford, H.A., Warren, J.S., 2000. *Loxosceles* deserta spider venom induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in keratinocytes. *Inflammation* 24, 1–9.
- de Santi Ferrara, G.I., Fernandes-Pedrosa, M.F., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Gonçalves-de-Andrade, R.M., Portaro, F.C., Manzoni-de-Almeida, D., Murakami, M.T., Arni, R.K., van den Berg, C.W., Ho, P.L., Tambourgi, D.V., 2009. SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: molecular cloning, expression, function and structural analysis. *Toxicon* 53, 743–753.
- de Souza, A.L., Malaque, C.M., Sztajnbock, J., Romano, C.C., Duarte, A.J., Seguro, A.C., 2008. *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. *Toxicon* 51, 151–156.
- Devaraja, S., Girish, K.S., Devaraja, V.R., Kemparaju, K., 2010. Factor Xa-like and fibrin(ogen)olytic activities of a serine protease from Hippasa agelenoides spider venom gland extract. *J. Thromb. Thrombolysis* 29, 119–126.
- Dias-Lopes, C., Felicori, L., Guimarães, G., Gomes, E.R., Roman-Campos, D., Duarte, H., Damasceno, D., Martins, M., Kalapothakis, E., Almeida, A.P., Granier, C., Cruz, J.S., Guatimosim, S., Chávez-Olortegui, C., 2010. Cardiotoxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom and the recombinant venom toxin rLiD1. *Toxicon* 56, 1426–1435.
- Domingos, M.O., Barbaro, K.C., Tynan, W., Penny, J., Lewis, D.J., New, R.R., 2003. Influence of sphingomyelin and TNF-alpha release on lethality and local inflammatory reaction induced by *Loxosceles gaucho* spider venom in mice. *Toxicon* 42, 471–479.
- Donepudi, S.K., Ahmed, K.A., Stocks, R.M., Nelson, D., Thompson, J.W., 2005. Aural involvement in loxoscelism: case report and literature review. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 69, 1559–1561.
- dos Santos, V.L., Franco, C.R.C., Viggiano, R.L., da Silveira, R.B., Cantão, M.P., Mangili, P.C., Veiga, S.S., Gremski, W., 2000. Structural and ultra-structural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia*. *Toxicon* 38, 265–285.
- dos Santos, L.D., Dias, N.B., Pinto, J.R.A.S., Palma, M.S., 2009. Brown recluse spider venom: proteomic analysis and proposal of a putative mechanism of action. *Protein Pept. Lett.* 16, 933–943.
- Dragulev, B., Bao, Y., Ramos-Cerrillo, B., Vazquez, H., Olvera, A., Stock, R., Algaron, A., Fox, J.W., 2007. Upregulation of IL-6, IL-8, CXCL1, and CXCL2 dominates gene expression in human fibroblast cells exposed to *Loxosceles reclusa* sphingomyelinase D: insights into spider venom dermonecrosis. *J. Invest. Dermatol.* 127, 1264–1266.
- Duarte, M.M., Montes De Oca, H., Diniz, C.R., Fortes-Dias, C.L., 1999. Primary culture of venom gland cells from the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon* 37, 1673–1682.
- Duncan, R.P., Rynerson, M.R., Ribera, C., Binford, G.J., 2010. Diversity of *Loxosceles* spiders in Northwestern Africa and molecular support for cryptic species in the *Loxosceles rufescens* lineage. *Mol. Phylogenet. Evol.* 55, 234–248.
- Duterte, S., Lewis, R.J., 2010. Use of venom peptides to probe ion channel structure and function. *J. Biol. Chem.* 285, 13315–13320.
- Dyachenko, P., Ziv, M., Rozenman, D., 2006. Epidemiological and clinical manifestations of patients hospitalized with brown recluse spider bite. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 20, 1121–1125.
- Efferth, T., 2005. Mechanistic perspectives for 1,2,4-trioxanes in anti-cancer therapy. *Drug Resist. Updat.* 8, 85–97.
- Elbahlawan, L.M., Stidham, G.L., Bugnitz, M.C., Storgion, S.A., Quasney, M.W., 2005. Severe systemic reaction to *Loxosceles reclusa* spider bites in a pediatric population. *Pediatr. Emerg. Care* 21, 177–180.
- Eskafi, F.M., Norment, B.R., 1976. Physiological action of *Loxosceles reclusa* venom on insect larvae. *Toxicon* 14, 7–12.
- Estrada, G., Garcia, B.I., Schiavon, E., Ortiz, E., Cestele, S., Wanke, E., Possani, L.D., Corzo, G., 2007. Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin CxIII: heterologous expression and proper folding in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 1161–1168.
- Feitosa, L., Gremski, W., Veiga, S.S., Elias, M.C., Graner, E., Mangili, O.C., Brentani, R.R., 1998. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* 36, 1039–1051.
- Felicori, L., Araujo, S.C., de Avila, R.A., Sanchez, E.F., Granier, C., Kalapothakis, E., Chavez-Olortegui, C., 2006. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. *Toxicon* 48, 509–519.
- Felicori, L., Fernandes, P.B., Giusta, M.S., Duarte, C.G., Kalapothakis, E., Nguyen, C., Molina, F., Granier, C., Chávez-Olortegui, C., 2009. An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. *Vaccine* 27, 4201–4208.
- Fernandes-Pedrosa, M.F., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Gonçalves-de-Andrade, R.M., van den Berg, C.W., Ramos, C.R., Ho, P.L., Tambourgi, D.V., 2002. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 638–645.
- Fernandes-Pedrosa, M.F., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Gonçalves-de-Andrade, R.M., Kobashi, L.S., Almeida, D.D., Ho, P.L., Tambourgi, D.V., 2008. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. *BMC Genomics* 9, 279.
- Ferrer, V.P., de Mari, T.L., Gremski, L.H., Trevisan-Silva, D., da Silveira, R.B., Gremski, W., Chaim, O.M., Senff-Ribeiro, A., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2013. A novel hyaluronidase from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom (Dietrich's Hyaluronidase): from cloning to functional characterization. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2206.
- Fischer, M.L., Vasconcellos-Neto, J., 2005a. Development and life tables of *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934 (Araneae, Sicariidae). *J. Arachnol.* 33, 758–766.
- Fischer, M.L., Vasconcellos-Neto, J., 2005b. Microhabitats occupied by *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* (Araneae: Sicariidae) in Curitiba, Paraná, Brazil. *J. Med. Entomol.* 42, 756–765.
- Flight, S.M., Johnson, L.A., Trabi, M., Gaffney, P., Lavin, M., de Jersey, J., Masci, P., 2005. Comparison of textilinin-1 with aprotinin as serine protease inhibitors and as antifibrinolytic agents. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 34, 188–193.
- França, F.O.S., Barbaro, K.C., Abdulkader, C.R.M., 2002. Rhabdomyolysis in presumed viscerocutaneous loxoscelism: report of two cases. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* 96, 287–290.
- Funk, C., Gmür, J., Herold, R., Straub, P.W., 1971. Reptilase-R—a new reagent in blood coagulation. *Br. J. Haematol.* 21, 43–52.
- Gilbert, S.F., Raunio, A.M., 1997. Embryology: Constructing the Organism. Sinauer Associates, Incorporated, Sunderland, MA, USA.
- Girish, K.S., Shashidharamurthy, R., Nagaraju, S., Gowda, T.V., Kemparaju, K., 2004. Isolation and characterization of hyaluronidase a “spreading factor” from Indian cobra (*Naja naja*) venom. *Biochimie* 86, 193–202.
- Girish, K.S., Kemparaju, K.A., 2005. Low molecular weight isoform of hyaluronidase: purification from Indian cobra (*Naja naja*) venom and partial characterization. *Biochemistry* 70, 708–712.
- Girish, K.S., Kemparaju, K., 2007. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.* 80, 1921–1943.
- Gomes, M.T., Guimarães, G., Frézard, F., Kalapothakis, E., Minozzo, J.C., Chaim, O.M., Veiga, S.S., Oliveira, S.C., Chávez-Olortegui, C., 2011. Determination of sphingomyelinase-D activity of *Loxosceles* venoms in sphingomyelin/cholesterol liposomes containing horseradish peroxidase. *Toxicon* 57, 574–579.



- Gomez, H.F., Miller, M.J., Desai, A., Warren, J.S., 1999. Loxosceles spider venom induces the production of alpha and beta chemokines: implications for the pathogenesis of dermonecrotic arachnidism. *Inflammation* 23, 207–215.
- Gomez, H.F., Miller, M.J., Waggner, M.W., Lankford, H.A., Warren, J.S., 2001. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important North American Loxosceles spider species. *Toxicon* 39, 817–824.
- Gomez, H.F., Krywko, D.M., Stoecker, W.V., 2002. A new assay for the detection of Loxosceles species (brown recluse) spider venom. *Ann. Emerg. Med.* 39, 469–474.
- Gomis-Rüth, F.X., 2003. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol. Biotechnol.* 24, 157–202.
- Gomis-Rüth, F.X., Trillo-Muyo, S., Stöcker, W., 2012. Functional and structural insights into astacin metallopeptidases. *Biol. Chem.* 393, 1027–1041.
- Gonçalves-de-Andrade, R.M., Bertani, R., Nagahama, R.H., Barbosa, M.F.R., 2012. Loxosceles niedeguidonae (Araneae, Sicariidae) a new species of brown spider from Brazilian semi-arid region. *Zookeys* 175, 27–36.
- Graidist, P., Yazawa, M., Tonganunt, M., Nakatomi, A., Lin, C.C., Chang, J.Y., Phongdara, A., Fujise, K., 2007. Fortilin binds  $\text{Ca}^{2+}$  and blocks  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent apoptosis in vivo. *Biochem. J.* 408, 181–191.
- Gremski, L.H., da Silva, R.B., Chaim, O.M., Probst, C.M., Ferrer, V.P., Nowatzki, J., Weinschutz, H.C., Madeira, H.M., Gremski, W., Nader, H.B., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2010. A novel expression profile of the Loxosceles intermedia venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Mol. Biosyst.* 6, 2403–2416.
- Guo, Y., Zuo, Y.F., Wang, Q.Z., Tang, B.S., Li, F.K., Sun, Y., 2006. Meta-analysis of defibrase in treatment of acute cerebral infarction. *Chin. Med. J. (Engl.)* 119, 662–668.
- Gutiérrez, J.M., León, G., Burnouf, T., 2011. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead. *Biologicals* 39, 129–142.
- Henriksen, A., King, T.P., Mirza, O., Monsalve, R.I., Meno, K., Ipsen, H., Larsen, J.N., Gajhede, M., Spangfort, M.D., 2001. Major venom allergen of yellow jackets, Ves v. 5: structural characterization of a pathogenesis related protein superfamily. *Proteins* 45, 438–448.
- Hinojosa-Moya, J., Xocoostle-Cazares, B., Piedra-Ibarra, E., Mendez-Tenorio, A., Lucas, W.J., Ruiz-Medrano, R., 2008. Phylogenetic and structural analysis of translationally controlled tumor proteins. *J. Mol. Evol.* 66, 472–483.
- Hoffman, D.R., 2008. Structural biology of allergens from stinging and biting insects. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 8, 338–342.
- Hogan, C.J., Barbaro, K.C., Winkel, K., 2004. Loxoscelism: old obstacles, new directions. *Ann. Emerg. Med.* 44, 608–624.
- Horta, C.C., Oliveira-Mendes, B.B., do Carmo, A.O., Siqueira, F.F., Barroca, T.M., dos Santos, N.L.S.M., de Almeida Campos Jr., P.H., de Franca, L.R., Ferreira, R.L., Kalapothakis, E., 2013. Lysophosphatidic acid mediates the release of cytokines and chemokines by human fibroblasts treated with Loxosceles spider venom. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1682–1685.
- Hostetler, M.A., Dribben, W., Wilson, D.B., Grossman, W.J., 2003. Sudden unexplained hemolysis occurring in an infant due to presumed Loxosceles envenomation. *J. Emerg. Med.* 25, 277–282.
- Hubbard, J.J., James, L.P., 2011. Complications and outcomes of brown recluse spider bites in children. *Clin. Pediatr.* 50, 252–258.
- Huguet, J.L.B., Novo, J.A.S., Guzmán, A.N., 2012. Picadura por Loxosceles rufescens (araña parda o del rincón). *FMC* 19, 517–518.
- Hynes, W.L., Walton, S.L., 2000. Hyaluronidases of gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 201–207.
- Isbister, G.K., Graudins, A., White, J., Warrell, D., 2003. Antivenom treatment in arachnidism. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 41, 291–300.
- Isbister, G.K., Fan, H.W., 2011. Spider bite. *Lancet* 378, 2039–2047.
- Iyer, S., Acharya, K.R., 2011. Tying the knot: the cystine signature and molecular-recognition processes of the vascular endothelial growth factor family of angiogenic cytokines. *FEBS J.* 278, 4304–4322.
- Jong, Y.S., Normant, B.R., Heitz, J.R., 1979. Separation and characterization of venom components in Loxosceles reclusa-II. Protease enzyme activity. *Toxicon* 16, 529–537.
- Kalapothakis, E., Araujo, S.C., de Castro, C.S., Mendes, T.N., Gomez, M.V., Mangili, O.C., Gubert, L.C., Chavez-Olortegui, C., 2002. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of Loxosceles intermedia spider venom. *Toxicon* 40, 1691–1699.
- Kalapothakis, E., Chatzaki, M., Gonçalves-Dornelas, H., de Castro, C.S., Silvestre, F.G., Laborne, F.V., de Moura, J.F., Veiga, S.S., Chávez-Olortegui, C., Granier, C., Barbaro, K.C., 2007. The Ioxtox protein family in Loxosceles intermedia (Mello-Leitão) venom. *Toxicon* 50, 938–946.
- Kemparaju, K., Girish, K.S., 2006. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. *Cell. Biochem. Funct.* 24, 7–12.
- Kimura, T., Ono, S., Kubo, T., 2012. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNAs encoding toxin-like peptides from the venom glands of tarantula Grammostola rosea. *Int. J. Pept.* 2012, ID: 731293.
- King, G.F., Gentz, M.C., Escoubas, P., Nicholson, G.M., 2008. A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon* 52, 264–276.
- King, G.F., 2011. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 11, 1469–1484.
- Kini, R.M., 2005. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 34, 200–204.
- Klint, J.K., Senff, S., Rupasinghe, D.B., Er, S.Y., Herzig, V., Nicholson, G.M., King, G.F., 2012. Spider-venom peptides that target voltage-gated sodium channels: pharmacological tools and potential therapeutic leads. *Toxicon* 60, 478–491.
- Kondo, H., Abe, K., Nishimura, I., Watanabe, H., Emori, Y., Arai, S., 1990. Two distinct cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. *Molecular cloning, expression, and biochemical studies on oryzaecystatin-II*. *J. Biol. Chem.* 265, 15832–15837.
- Kusma, J., Chaim, O.M., Wille, A.C., Ferrer, V.P., Sade, Y.B., Donatti, L., Gremski, W., Mangili, O.C., Veiga, S.S., 2008. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. *Biochimie* 90, 1722–1736.
- Lane, D.R., Youse, J.S., 2004. Coombs-positive hemolytic anemia secondary to brown recluse spider bite: a review of the literature and discussion of treatment. *Cutis* 74, 341–347.
- Lane, L., McCoppin, H.H., Dyer, J., 2011. Acute generalized exanthematous pustulosis and Coombs positive hemolytic anemia in a child following Loxosceles reclusa envenomation. *Pediatr. Dermatol.* 28, 685–688.
- Lee, S., Lynch, K.R., 2005. Brown recluse spider (Loxosceles reclusa) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem. J.* 391, 317–323.
- Li, F., Zhang, D., Fujise, K., 2001. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. *J. Biol. Chem.* 276, 47542–47549.
- Liu, S., Marder, V.J., Levy, D.E., Wang, S.J., Yang, F., Paganini-Hill, A., Fisher, M.J., 2011. Anecdotal and fibrin formation: perspectives on mechanisms of action. *Stroke* 42, 3277–3280.
- Lockett, C.J., Dhileepan, K., Robinson, M., Pukallus, K.J., 2012. Impact of a biological control agent, Chiasmia assimilis, on prickly acacia (Acacia nilotica ssp. indica) seedlings. *Biol. Control* 62, 183–188.
- Lokeshwar, V.B., Selzer, M.G., 2008. Hyaluronidase: both a tumor promoter and suppressor. *Semin. Cancer Biol.* 18, 281–287.
- Lucato Jr., R.V., Abdulkader, R.C., Barbaro, K.C., Mendes, G.E., Castro, I., Baptista, M.A., Cury, P.M., Malheiros, D.M., Schor, N., Yu, L., Burdmann, E.A., 2011. Loxosceles gaucho venom-induced acute kidney injury—in vivo and in vitro studies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1182.
- Luciano, M.N., Silva, P.H., Chaim, O.M., Santos, V.P., Franco, C.R.C., Soares, M.F.S., Zanata, S.M., Mangili, O., Gremski, O.C., Veiga, S.S., 2004. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of Loxosceles intermedia (brown spider) venom on renal tissue. *J. Histochem. Cytochem* 52, 455–467.
- Lung, J.M., Mallory, S.B., 2000. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. *Int. J. Dermatol.* 39, 287–289.
- Ma, Y., He, Y., Zhao, R., Wu, Y., Li, W., Cao, Z., 2012. Extreme diversity of scorpion venom peptides and proteins revealed by transcriptomic analysis: implication for proteome evolution of scorpion venom arsenal. *J. Proteomics* 75, 1563–1576.
- Machado, L.F., Laugesen, S., Botelho, E.D., Ricart, C.A., Fontes, W., Barbaro, K.C., Roepstorff, P., Sousa, M.V., 2005. Proteome analysis of brown spider venom: identification of Ioxnecrogin isoforms in Loxosceles gaucho venom. *Proteomics* 5, 2167–2176.
- Maeng, J., Kim, H.Y., Shin, D.H., Lee, K., 2013. Transduction of translationally controlled tumor protein employing TCTP-derived protein transduction domain. *Anal. Biochem* 435, 47–53.
- Magalhães, M.R., da Silva Jr., N.J., Ulhoa, C.J., 2008. A hyaluronidase from Potamotrygon motoro (freshwater stingrays) venom: isolation and characterization. *Toxicon* 51, 1060–1067.
- Magalhães, G.S., Caporino, M.C., Della-Casa, M.S., Kimura, L.F., Prezotto-Neto, J.P., Fukuda, D.A., Portes-Junior, J.A., Neves-Ferreira, A.G.C., Santoro, M.L., Barbaro, K.C., 2013. Cloning, expression and characterization of a phospholipase D from Loxosceles gaucho venom gland. *Biochimie* 95, 1773–1783.
- Makris, M., Spanoudaki, N., Giannoula, F., Chliva, C., Antoniadou, A., Kalogeromitros, D., 2009. Acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP) triggered by a spider bite. *Allergol. Int.* 58, 301–303.
- Malake, C.M., Santoro, M.L., Cardoso, J.L., Conde, M.R., Novaes, C.T., Risk, J.Y., França, F.O., de Medeiros, C.R., Fan, H.W., 2011. Clinical

- picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. *Toxicon* 58, 664–671.
- Manríquez, J.J., Silva, S., 2009. Cutaneous and visceral loxoscelism: a systematic review. *Rev. Chil. Infectol.* 26, 420–432.
- Marchesini, N., Hannun, Y.A., 2004. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem. Cell. Biol.* 82, 27–44.
- Markovic-Housley, Z., Miglierini, G., Soldatova, L., Rizkallah, P.J., Muller, U., Schirmer, T., 2000. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure* 8, 1025–1035.
- Matsubara, F.H., Gremski, L.H., Meissner, G.O., Soares, E.C.L., Gremski, W., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2013. A novel ICK peptide from the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland: cloning, heterologous expression and immunological cross-reactivity approaches. *Toxicon* 71, 147–178.
- McDade, J., Aygun, B., Ware, R.E., 2010. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) envenomation leading to acute hemolytic anemia in six adolescents. *J. Pediatr.* 156, 155–157.
- McDonald, S.M., Rafnar, T., Langdon, J., Lichtenstein, L.M., 1995. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* 269, 688–690.
- McGlasson, D.L., Babcock, J.L., Berg, L., Triplett, D.A., 1993. ARACHNase. An evaluation of a positive control for platelet neutralization procedure testing with seven commercial activated partial thromboplastin time reagents. *Am. J. Pathol.* 100, 576–578.
- Menaldo, D.L., Bernardes, C.P., Santos-Filho, N.A., Moura, L.D., Fuly, A.L., Arantes, E.C., Sampaio, S.V., 2012. Biochemical characterization and comparative analysis of two distinct serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom. *Biochimie* 94, 2545–2558.
- Mendes, T.M., Oliveira, D., Figueiredo, L.F., Machado-de-Avila, R.A., Duarte, C.G., Dias-Lopes, C., Guimarães, G., Felicori, L., Minozzo, J.C., Chávez-Olortegui, C., 2013. Generation and characterization of a recombinant chimeric protein (rCpLi) consisting of B-cell epitopes of a dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom. *Vaccine* 31, 2749–2755.
- Möhrhén, F., Hutter, H., Zwilling, R., 2003. The astacin protein family in *Caenorhabditis elegans*. *Eur. J. Biochem.* 270, 4909–4920.
- Möhrhén, F., Maniura, M., Plickert, G., Frohme, M., Frank, U., 2006. Evolution of astacin-like metalloproteases in animals and their function in development. *Evol. Dev.* 8, 223–231.
- Moore, S.J., Leung, C.L., Cochran, J.R., 2011. Knottins: disulfide-bonded therapeutic and diagnostic peptides. *Drug. Discov. Today Technol.* 9, e3–e11.
- Morey, S.S., Kiran, K.M., Gadag, J.R., 2006. Purification and properties of hyaluronidase from *Palameus gravimanus* (Indian black scorpion) venom. *Toxicon* 47, 188–195.
- Morgenstern, D., King, G.F., 2013. The venom optimization hypothesis revisited. *Toxicon* 63, 120–128.
- Mota, I., Barbaro, K.C., 1995. Biological and biochemical-properties of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. *J. Toxicol. Tox. Rev.* 14, 401–421.
- Muanpasitporn, C., Rojnuckarin, P., 2007. Expression and characterization of a recombinant fibrinolytic serine protease from green pit viper (*Trimeresurus albolabris*) venom. *Toxicon* 49, 1083–1089.
- Mulenga, A., Azad, A.F., 2005. The molecular and biological analysis of ixodid ticks histamine release factors. *Exp. Appl. Acarol.* 37, 215–229.
- Mullin, J.L., Gorkun, O.V., Binnie, C.G., Lord, S.T., 2000. Recombinant fibrinogen studies reveal that thrombin specificity dictates order of fibrinopeptide release. *J. Biol. Chem.* 275, 25239–25246.
- Murakami, M.T., Fernandes-Pedrosa, M.F., Tambourgi, D.V., Arni, R.K., 2005. Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. *J. Biol. Chem.* 280, 13658–13664.
- Murakami, M.T., Fernandes-Pedrosa, M.F., de Andrade, S.A., Gabdoulkhakov, A., Betzel, C., Tambourgi, D.V., Arni, R.K., 2006. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 323–329.
- Navarro-Silva, M.A., Duque, J.E., Ramires, E.N., Andrade, C.F., Marques-da-Silva, E., Marques, F.A., Delay, C.E., Fontana, J.D., Silva, A.C., Fraguas, G.M., 2010. Chemical control of *Loxosceles intermedia* (Araneae: Sicariidae) with pyrethroids: field and laboratory evaluation. *J. Econ. Entomol.* 103, 166–171.
- Nene, V., Wortman, J.R., Lawson, D., Haas, B., Kodira, C., Tu, Z.J., Loftus, B., Xi, Z., Megy, K., Grabherr, M., Ren, Q., Zdobnov, E.M., Lobo, N.F., Campbell, K.S., Brown, S.E., Bonaldo, M.F., Zhu, J., Sinkins, S.P., Hogenkamp, D.G., Amedeo, P., Arensburg, P., Atkinson, P.W., Bidwell, S., Biedler, J., Birney, E., Bruggner, R.V., Costas, J., Coy, M.R., Crabtree, J., Crawford, M., Debruyne, B., Decaprio, D., Eigelmeier, K., Eisenstadt, E., El-Dorri, H., Gelbart, W.M., Gomes, S.L., Hammond, M., Hannick, L.I., Hogan, J.R., Holmes, M.H., Jaffe, D., Johnston, J.S., Kennedy, R.C., Koo, H., Kravitz, S., Kriventseva, E.V., Kulp, D., Labutti, K., Lee, E., Li, S., Lovin, D.D., Mao, C., Mauceli, E., Menck, C.F., Miller, J.R., Montgomery, P., Mori, A., Nascimento, A.L., Naveira, H.F., Nusbaum, C., O'leary, S., Orvis, J., Perte, M., Quesneville, H., Reidenbach, K.R., Rogers, Y.H., Roth, C.W., Schneider, J.R., Schatz, M., Shumway, M., Stanke, M., Stinson, E.O., Tubio, J.M., Vanze, J.P., Verjovski-Almeida, S., Werner, D., White, O., Wyder, S., Zeng, Q., Zhao, Q., Zhao, Y., Hill, C.A., Raikhel, A.S., Soares, M.B., Knudson, D.L., Lee, N.H., Galagan, J., Salzberg, S.L., Paulsen, I.T., Dimopoulos, G., Collins, F.H., Birren, B., Fraser-Liggett, C.M., Severson, D.W., 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* 316, 1718–1723.
- Neiva, M., Arraes, F.B., de Souza, J.V., Rádis-Baptista, G., Prieto-da-Silva, A.R., Walter, M.E., Brígido, M., de M., Yamane, T., Lopez-Lozano, J.L., Astolfi-Filho, S., 2009. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). *Toxicon* 53, 427–436.
- Neshich, G., Borro, L.C., Higa, R.H., Kuser, P.R., Yamagishi, M.E., Franco, E.H., Krauchenco, J.N., Fileto, R., Ribeiro, A.A., Bezerra, G.B., Velludo, T.M., Jimenez, T.S., Furukawa, N., Teshima, H., Kitajima, K., Bava, A., Sarai, A., Togawa, R.C., Mancini, A.L., 2005. The Diamond STING server. *Nucleic Acids Res.* 33, W29–W35.
- Nicholson, G.M., Little, M.J., Liesl, C., Birinyi-Strachan, L.C., 2004. Structure and function of d-atracotoxins: lethal neurotoxins targeting the voltage-gated sodium channel. *Toxicon* 43, 587–599.
- Nowatzki, J., de Sene, R.V., Paludo, K.S., Veiga, S.S., Oliver, C., Jamur, M.C., Nader, H.B., Trindade, E.S., Franco, C.R.C., 2010. Brown spider venom toxins interact with cell surface glycoconjugates and are endocytosed by rabbit endothelial cells. *Toxicon* 56, 535–543.
- Olvera, A., Ramos-Cerrillo, B., Estévez, J., Clement, H., de Roodt, A., Paniagua-Solís, J., Vázquez, H., Zavaleta, A., Arruz, M.S., Stock, R.P., Alagón, A., 2006. North and South American *Loxosceles* spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. *Toxicon* 48, 64–74.
- Ospedal, K.Z., Appel, M.H., Neto, J.F., Mangili, O.C., Veiga, S.S., Gremski, W., 2002. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Int. J. Exp. Pathol.* 84, 287–294.
- Padavattan, S., Schmidt, M., Hoffman, D.R., Markovic-Housley, Z., 2008. Crystal structure of the major allergen from fire ant venom. *J. Mol. Biol.* 383, 178–185.
- Paludo, K.S., Gremski, L.H., Veiga, S.S., Chaim, O.M., Gremski, W., Buchi, D.F., 2006. The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. *Toxicon* 47, 844–853.
- Paludo, K.S., Biscals, S.M.P., Chaim, O.M., Otuki, M.F., Naliwaiko, K., Dombrowski, P.A., Franco, C.R.C., Veiga, S.S., 2009. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: a pharmacological investigation. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 149, 323–333.
- Patel, K.D., Modur, V., Zimmerman, G.A., 1994. The necrotic venom of the brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation: differential induction of GM-CSF, IL-8, and E-selectin expression. *J. Clin. Invest.* 94, 631–642.
- Pauli, I., Minozzo, J.C., da Silva, P.H., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2009. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). *Toxicon* 53, 660–671.
- Pernet, C., Dandurand, M., Meunier, L., Stoeber, P.E., 2010. Necrotic arachnidism in the south of France: two clinical cases of loxoscelism. *Ann. Dermatol. Venerol.* 137, 808–812.
- Pippirs, U., Mehlhorn, H., Antal, A.S., Schulte, K.W., Homey, B., 2009. Acute generalized exanthematous pustulosis following a *Loxosceles* spider bite in Great Britain. *Br. J. Dermatol.* 161, 208–209.
- Platnick, N.I., 2013. The World Spider Catalog, Version 14.0. American Museum of Natural History. Online at: <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog> (Accessed July 2013).
- Pretel, F., Gonçalves-De-Andrade, R.M., Magnoli, F.C., da Silva, M.E., Ferreira Jr., J.M.C., van den Berg, C.W., Tambourgi, D.V., 2005. Analysis of the toxic potential of venom from *Loxosceles adelaia*, a Brazilian brown spider from karstic areas. *Toxicon* 45, 449–458.
- Rader, R.K., Stoecker, W.V., Malters, J.M., Marr, M.T., Dyer, J.A., 2012. Seasonality of brown recluse populations is reflected by numbers of brown recluse envenomations. *Toxicon* 60, 1–3.
- Ramires, E.N., Fraguas, G.M., 2004. Tropical house gecko (*Hemidactylus mabouia*) Predation on brown spiders (*Loxosceles intermedia*). *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 10, 185–190.
- Ramires, E.N., Retzlaff, A.V.L., Deconto, L.R., Fontana, J.D., Marques, F.A., Marques-da-Silva, E., 2007. Evaluation of the efficacy of vacuum



- cleaners for the integrated control of brown spider *Loxosceles intermedia*. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 13, 607–619.
- Ramos-Cerrillo, B., Olvera, A., Odell, G.V., Zamudio, F., Paniagua-Solís, J., Alagón, A., Stock, R.P., 2004. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. *Toxicon* 44, 507–514.
- Rattmann, Y.D., Pereira, C.R., Cury, Y., Gremski, W., Marques, M.C., da Silva-Santos, J.E., 2008. Vascular permeability and vasodilation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: involvement of mast cell degranulation, histamine and 5-HT receptors. *Toxicon* 51, 363–372.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Bateman, A., 2012. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic. Acids. Res.* 40 (Database issue), D343–D350.
- Reiting, S., Boroviak, T., Laschober, G.T., Fehrer, C., Müllegger, J., Lindner, H., Leppendörfer, G., 2008. High-yield recombinant expression of the extremophile enzyme, bee hyaluronidase in *Pichia pastoris*. *Protein. Expr. Purif.* 57, 226–233.
- Ribeiro, R.O.S., Chaim, O.M., da Silveira, R.B., Gremski, L.H., Sade, Y.B., Paludo, K.S., Senff-Ribeiro, A., de Moura, J., Chávez-Olortegui, C., Gremski, W., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2007. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase-D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* 50, 1162–1174.
- Ribuffo, D., Serratore, F., Famiglietti, M., Greco, M., Fois, F., Atzori, L., Pau, M., Aste, N., 2012. Upper eyelid necrosis and reconstruction after spider bite: case report and review of the literature. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 16, 414–417.
- Robb, C.W., Hayes, B.B., Boyd, A.S., 2007. Generalized vasculitic exanthem following *Loxosceles reclusa* envenomation. *J. Cutan. Pathol.* 34, 513–514.
- Rokytka, D.R., Wray, K.P., Lemmon, A.R., Lemmon, E.M., Caudle, S.B., 2011. A high-throughput venom-gland transcriptome for the Eastern Diamondback Rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) and evidence for pervasive positive selection across toxin classes. *Toxicon* 57, 657–671.
- Roodt, A.R., Litwin, S., Dokmetjian, J.C., Vidal, J.C., 2002. A reduced immunization scheme to obtain an experimental anti-*Loxosceles laeta* (violinist spider) venom. *J. Nat. Toxins* 11, 193–203.
- Rosen, J.L., Dumitru, J.K., Langley, E.W., Meade Olivier, C.A., 2012. Emergency department death from systemic loxoscelism. *Ann. Emerg. Med.* 60, 439–441.
- Ruiming, Z., Yibao, M., Yawen, H., Zhiyong, D., Yingliang, W., Zhijian, C., Wenxin, L., 2010. Comparative venom gland transcriptome analysis of the scorpion *Lychas mucronatus* reveals intraspecific toxic gene diversity and new venomous components. *BMC Genomics* 11, 452.
- Ruppert, E.E., Fox, R.S., Barnes, R.D., 2004. *Invertebrate Zoology*, seventh ed. Brooks Cole Thomson, UK.
- Sade, Y.B., Bóia-Ferreira, M., Gremski, L.H., da Silveira, R.B., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2012. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 170–177.
- Sams, H.H., Dunnick, C.A., Smith, M.L., King, L.E., 2001. Necrotic arachnidism. *J. Am. Acad. Dermatol.* 44, 561–573.
- Sanchez-Olivas, M.A., Valencia-Zavala, M.P., Sánchez-Olivas, J.A., Sepulveda-Velázquez, G., Vega-Robledo, G., 2011. Cutaneous necrotic loxoscelism. A case report. *Rev. Alerg. Mex.* 58, 171–176.
- Sandidge, J., 2004. Predation by cosmopolitan spiders upon the medically significant pest species *Loxosceles reclusa* (Araneae: Sicariidae): limited possibilities for biological control. *J. Econ. Entomol.* 97, 230–234.
- Sandidge, J.S., Hopwood, J.L., 2005. Brown recluse spiders: a review of biology, life history and pest management. *Kans. Acad. Sci.* 108, 99–108.
- Saupe, E.E., Papes, M., Selden, P.A., Vetter, R.S., 2011. Tracking a medically important spider: climate change, ecological niche modeling, and the brown recluse (*Loxosceles reclusa*). *PLoS One* 6, e17731.
- Schenone, F.H., Rubio, A.S., Saavedra, U.T., Rojas, S.A., 2001. Loxoscelismo en pediatría. Región Metropolitana, Chile. *Rev. Chil. Pediatr.* 72, 100–109.
- Schmid-Grendelmeier, P., Cramer, R., 2001. Recombinant allergens for skin testing. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 125, 96–111.
- Schroeder, F.C., Taggi, A.E., Gronquist, M., Malik, R.U., Grant, J.B., Eisner, T., Meinwald, J., 2008. NMR-spectroscopic screening of spider venom reveals sulfated nucleosides as major components for the brown recluse and related species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14283–14287.
- Senff-Ribeiro, A., da Silva, P.H., Chaim, O.M., Gremski, L.H., Paludo, K.S., da Silveira, R.B., Gremski, W., Mangili, O.C., Veiga, S.S., 2008. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. *Biotechnol. Adv.* 26, 210–218.
- Silva, L.M., Lages, C.P., Venuto, T., Lima, R.M., Diniz, M.V., Valentim, C.L.L., Baba, E.H., Pimenta, P.F.P., Fortes-Dias, C.L., 2008. Primary culture of venom glands from the Brazilian armed spider, *Phoneutria nigriventer* (Araneae, Ctenidae). *Toxicon* 51, 428–434.
- Silvestre, F.G., de Castro, C.S., de Moura, J.F., Giusta, M.S., de Maria, M., Alvares, E.S., Lobato, F.C., Assis, R.A., Gonçalves, L.A., Gubert, I.C., Chávez-Olortegui, C., Kalapothakis, E., 2005. Characterization of the venom from the Brazilian brown spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). *Toxicon* 46, 927–936.
- Sterchi, E.E., Stöcker, W., Bond, J.S., 2008. Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Mol. Asp. Med.* 29, 309–328.
- Stock, R.P., Brewer, J., Wagner, K., Ramos-Cerrillo, B., Duellund, L., Jernshøj, K.D., Olsen, L.F., Bagatolli, L.A., 2012. Sphingomyelinase D activity in model membranes: structural effects of in situ generation of ceramide-1-phosphate. *PLoS One* 7, e36003.
- Stoecker, W.V., Green, J.A., Gomez, H.F., 2006. Diagnosis of loxoscelism in a child confirmed with an enzyme-linked immunosorbent assay and noninvasive tissue sampling. *J. Am. Acad. Dermatol.* 55, 888–890.
- Stoecker, W.V., Wasserman, G.S., Calcara, D.A., Green, J.A., Larkin, K., 2009. Systemic loxoscelism confirmation by bite-site skin surface: ELISA. *Mo. Med.* 106, 425–431.
- Susini, L., Besse, S., Duflaut, D., Lespagnol, A., Beekman, C., Fiucci, G., Atkinson, A.R., Busso, D., Poussin, P., Marine, J.C., Martinou, J.C., Cavarelli, J., Moras, D., Amson, R., Telerman, A., 2008. TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. *Cell. Death Differ.* 15, 1211–1220.
- Swanson, D.L., Vetter, R.S., 2005. Bites of brown recluse spiders and suspected necrotic arachnidism. *N. Engl. J. Med.* 352, 700–707.
- Swanson, D.L., Vetter, R.S., 2006. Loxoscelism. *Clin. Dermatol.* 24, 213–221.
- Tambourgi, D.V., da Silva, M. de S., Billington, S.J., Gonçalves-de-Andrade, R.M., Magnoli, F.C., Songer, J.G., van den Berg, C.W., 2002. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. *Immunology* 107, 93–101.
- Tambourgi, D.V., Paixão-Cavalcante, D., Gonçalves-de-Andrade, R.M., Fernandes-Pedrosa, M.F., Magnoli, F.C., Paul Morgan, B., van den Berg, C.W., 2005. *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. *J. Investig. Dermatol.* 124, 725–731.
- Tambourgi, D.V., Pedrosa, M.F., de Andrade, R.M., Billington, S.J., Griffiths, M., van den Berg, C.W., 2007. Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis. *Mol. Immunol.* 44, 576–582.
- Tambourgi, D.V., Gonçalves-de-Andrade, R.M., van den Berg, C.W., 2010. Loxoscelism: from basic research to the proposal of new therapies. *Toxicon* 56, 1113–1119.
- Tani, M., Ito, M., Igarashi, Y., 2007. Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space. *Cell Signal.* 19, 229–237.
- Taskesen, M., Akdeniz, S., Tas, T., Keklikci, U., Tas, M.A., 2011. A rare cause of severe periorbital edema and dermonecrotic ulcer of the eyelid in a child: brown recluse spider bite. *Turk. J. Pediatr.* 53, 87–90.
- Tavares, F.L., Sousa-e-Silva, M.C., Santoro, M.L., Barbaro, K.C., Rebecchi, I.M., Sano-Martins, I.S., 2004. Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucha* spider venom. *Hum. Exp. Toxicol.* 23, 477–486.
- Tavares, F.L., Peichoto, M.E., Rangel, D.M., Barbaro, K.C., Cirillo, M.C., Santoro, M.L., Sano-Martins, I.S., 2011. *Loxosceles gaucha* spider venom and its sphingomyelinase fraction trigger the main functions of human and rabbit platelets. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 1567–1574.
- Telerman, A., Amson, R., 2009. The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation. *Nat. Rev. Cancer* 9, 206–216.
- Trevisan-Silva, D., Gremski, L.H., Chaim, O.M., da Silveira, R.B., Meissner, G.O., Mangili, O.C., Barbaro, K.C., Gremski, W., Veiga, S.S., Senff-Ribeiro, A., 2010. Astacin-like metalloproteinases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). *Biochimie* 92, 21–32.
- Trevisan-Silva, D., Gremski, L.H., Chaim, O.M., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2013. Chapter 247-*Loxosceles* astacin-like proteases (LALPs), an astacin metalloprotease family from the brown spider venom. In: Rawlings, N.D., Salvesen, G.S. (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, third ed. Academic Press, Oxford, pp. 1081–1086.
- Tutrone, W.D., Green, K.M., Norris, T., Weinberg, J.M., Clarke, D., 2005. Brown recluse spider envenomation: dermatologic application of hyperbaric oxygen therapy. *J. Drugs Dermatol.* 4, 424–428.

- Tuynder, M., Susini, L., Prieur, S., Besse, S., Fiucci, G., Amson, R., Telerman, A., 2002. Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14976–14981.
- Tuynder, M., Fiucci, G., Prieur, S., Lespagnol, A., Geant, A., Beaucourt, S., Duflaut, D., Besse, S., Susini, L., Cavarelli, J., Moras, D., Amson, R., Telerman, A., 2004. Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15364–15369.
- Ullah, A., de Giuseppe, P.O., Murakami, M.T., Trevisan-Silva, D., Wille, A.C.M., Chaves-Moreira, D., Gremski, L.H., da Silva, R.B., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O.M., Veiga, S.S., Arni, R.K., 2011. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 67, 234–236.
- Valenta, R., Linhart, B., Swoboda, I., Niederberger, V., 2011. Recombinant allergens for allergen specific immunotherapy: 10 years anniversary of immunotherapy with recombinant allergens. *Allergy* 66, 775–783.
- Valeriano-Zapana, J.A., Segovia-Cruz, F.S., Rojas-Hualpa, J.M., Martins-de-Souza, D., Ponce-Soto, L.A., Marangoni, S., 2012. Functional and structural characterization of a new serine protease with thrombin-like activity TLBan from *Bothrops andianus* (Andean Lancehead) snake venom. *Toxicon* 59, 231–240.
- van Hage-Hamsten, M., Pauli, G., 2004. Provocation testing with recombinant allergens. *Methods* 32, 281–291.
- van Meeteren, L.A., Frederiks, F., Giepmans, B.N., Pedrosa, M.F., Billington, S.J., Jost, B.H., Tambourgi, D.V., Moolenaar, W.H., 2004. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* 279, 10833–10836.
- van Meeteren, L.A., Stortelers, C., Moolenaar, W.H., 2007. Upregulation of cytokine expression in fibroblasts exposed to *Loxosceles* sphingomyelinase D: what is the trigger? *J. Invest. Dermatol.* 127, 1266–1268.
- Veiga, S.S., da Silva, R.B., Dreyfus, J.L., Haoach, J., Pereira, A.M., Mangili, O.C., Gremski, W., 2000a. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* 38, 825–839.
- Veiga, S.S., Feitosa, L., dos Santos, V.L., de Souza, G.A., Ribeiro, A.S., Mangili, O.C., Porcionatto, M.A., Nader, H.B., Dietrich, C.P., Brentani, R.R., Gremski, W., 2000b. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. *Histochem. J.* 32, 397–408.
- Veiga, S.S., Zanetti, V.C., Franco, C.R.C., Trindade, E.S., Porcionatto, M.A., Mangili, O.C., Gremski, W., Dietrich, C.P., Nader, H.B., 2001a. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. *Throm. Res.* 102, 229–237.
- Veiga, S.S., Zanetti, V.C., Braz, A., Mangili, O.C., Gremski, W., 2001b. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 843–850.
- Vetter, R.S., 2008. Spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae): a review of biological, medical and psychological aspects regarding envenomations. *J. Arachnol.* 36, 150–163.
- Vetter, R.S., Isbister, G.K., 2008. Medical aspects of spider bites. *Annu. Rev. Entomol.* 53, 409–429.
- Vetter, R.S., 2009. The distribution of brown recluse spiders in the southeastern quadrant of the United States in relation to loxoscelism diagnoses. *South. Med. J.* 102, 518–522.
- Vetter, R.S., 2011a. Scavenging by spiders (Araneae) and its relationship to pest management of the brown recluse spider. *J. Econ. Entomol.* 104, 986–989.
- Vetter, R.S., 2011b. Seasonality of brown recluse spiders, *Loxosceles reclusa*, submitted by the general public: implications for physicians regarding loxoscelism diagnoses. *Toxicon* 58, 623–625.
- Vitt, U.A., Hsu, S.Y., Hsueh, A.J.W., 2001. Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Mol. Endocrinol.* 15, 681–694.
- Vuitika, L., Gremski, L.H., Belisário-Ferrari, M.R., Chaves-Moreira, D., Ferrer, V.P., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2013. Identification, cloning and functional characterization of a novel phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom containing a conservative mutation (D233E) in the catalytic site. *J. Cell. Biochem.* 114, 2479–2492.
- Wille, A.C.M., Chaves-Moreira, D., Silva, D.T., Magnoni, M.G., Ferreira, M.B., Gremski, L.H., Gremski, W., Chaim, O.M., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2013. Modulation of membrane phospholipids, the cytosolic calcium influx and cell proliferation following treatment of B16-F10 cells with recombinant phospholipase-D from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* 67, 17–30.
- Wong, S.L., Defranzo, A.J., Morykwas, M.J., Argenta, L.C., 2009. Loxoscelism and negative pressure wound therapy (vacuum-assisted closure): a clinical case series. *Am. Surg.* 75, 1128–1131.
- Wood, D.L., Miljenovic, T., Cai, S., Raven, R.J., Kaas, Q., Escoubas, P., Herzig, V., Wilson, D., King, G.F., 2009. ArachnoServer: a database of protein toxins from spiders. *BMC Genomics* 10, 375.
- Wright, R.P., Elgert, K.D., Campbell, B.J., Barrett, J.T., 1973. Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 415–426.
- Yamanouye, N., Kerchove, C.M., Moura-da-Silva, A.M., Carneiro, S.M., Markus, R.P., 2007. Long-term primary culture of secretory cells of *Bothrops jararaca* venom gland for venom production in vitro. *Nat. Protoc.* 1, 2763–2766.
- Young, A.R., Pincus, S.J., 2001. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon* 39, 391–400.
- Yuan, C.H., He, Q.Y., Peng, K., Diao, J.B., Jiang, L.P., Tang, X., Liang, S.P., 2008. Discovery of a distinct superfamily of Kunitz-type toxin (KTT) from tarantulas. *PLoS One* 3, e3414.
- Zambrano, A., González, J., Callejas, G., 2005. Desenlace fatal por loxoscelismo cutáneo visceral. *Ver. Med. Chile* 133, 219–223.
- Zanetti, V.C., da Silva, R.B., Dreyfuss, J.L., Haoach, J., Mangili, O.C., Veiga, S.S., Gremski, W., 2002. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 13, 135–148.
- Zhang, Y., Chen, J., Tang, X., Wang, F., Jiang, L., Xiong, X., Wang, M., Rong, M., Liu, Z., Liang, S., 2010. Transcriptome analysis of the venom glands of the Chinese wolf spider *Lycosa singoriensis*. *Zoology* 113, 10–18.
- Zhao, R., Dai, H., Qiu, S., Li, T., He, Y., Ma, Y., Chen, Z., Wu, Y., Li, W., Cao, Z., 2011. SdPI, the first functionally characterized Kunitz-type trypsin inhibitor from scorpion venom. *PLoS One* 6, e27548.
- Zhu, S., Darbon, H., Dyason, K., Verdonck, F., Tytgat, J., 2003. Evolutionary origin of inhibitor cystine knot peptides. *FASEB J.* 17, 1765–1767.
- Zobel-Thropp, P.A., Kerins, A.E., Binford, G.J., 2012. Sphingomyelinase D in sicariid spider venom is a potent insecticidal toxin. *Toxicon* 60, 265–271.
- Zupunski, V., Kordis, D., Gubensek, F., 2003. Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. *FEBS Lett.* 547, 131–136.